UNIVERSITÉ DE PARIS
Année 1967-1968

FACULTÉ DE PHARMACIE
Série U N° 453

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Mention Pharmacie)

PAR

Sylvie FROÏM LEIBA
Pharmacien - Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris

SUJET DE LA THÈSE

Sur les flavonoïdes de la Bryone
(*Bryonia dioica* Jacq., Cucurbitacées)

Soutenue le 6 décembre 1967 devant la Commission d'examen

MM. R. PARIS — *Président*

P. DELAVEAU
J. L. GUIGNARD } *Examinateurs*

UNIVERSITÉ DE PARIS
Année 1967-1968

FACULTÉ DE PHARMACIE
Série U N° 453

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(Mention Pharmacie)

PAR

Sylvie FROÏM LEIBA
Pharmacien - Lauréat de la Faculté de Pharmacie de Paris

SUJET DE LA THÈSE

Sur les flavonoïdes de la Bryone

(*Bryonia dioica* Jacq., Cucurbitacées)

Soutenue le 6 décembre 1967 devant la Commission d'examen

MM. R. PARIS — *Président*
P. DELAVEAU — *Examinateurs*
J. L. GUIGNARD

UNIVERSITÉ DE PARIS - FACULTÉ DE PHARMACIE

Administration

MM. MALANGEAU P.	Doyen,	Mme ESPINASSE M.L.	Attachée
GUILLOT M.	Assesseur, O +	MM. BRENN A.	Attaché, +
DELAVEAU P.	Assesseur	JACOB A.	Attaché, +
RODINEAU L.	Secrétaire Général, +	Mme MUR A.M.	Attachée
Mme FERRARI S.	Attachée Principale	Melle FRIZOL E.	Attachée
M. JEANDEL L.	Attaché	M. TRICAN J.	Attaché

Professeurs Honoraires

MM. LAUNOY L.	O +	M. PICON M.	O +,
FLEURY P.	O +		

Professeurs

MM. JANOT M.-M., O+, Membre de l'Institut	Pharmacie Galénique (T)	MM. DEYSSON G.,	Botanique (T)
VALETTE G., O +,	Pharmacodynamie (T)	MICHEL R.,	Endocrinologie (T)
PARIS R., +	Matière Médicale (T)	FLAHAUT J.,	Minéralogie (T)
GUILLOT M., O +,	Physique (T)	RENAULT J.,	Chimie Organique (T)
GAUTIER J.A., O +,	Chimie Organique (T)	LE HIR A.,	Pharmacie Galénique (T)
Melle LAMBIN S., +,	Microbiologie (T)	BOUDENE C.,	Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)
RAOUL Y., +,	Physiologie (T)	DELAVEAU P.,	Matière Médicale et Séméiologie (T)
COURTOIS J., +,	Chimie Biologique (T)	LARUELLE P.,	Physique (T)
DOMANGE L., O +,	Chimie Générale et Minérale (T)	ROSSIGNOL P.,	Pharmacodynamie (T)
TRUHAUT R., O +, Membre de l'Institut	Toxicologie (T)	MANGEOT A.,	Pharmacie Galénique Industrielle
MORETTE A., +,	Hydrologie (T)	COHEN Y.,	Pharmacodynamie
CAVIER R., +,	Parasitologie (T)	RENAULT H.,	Physique
QUEVAUVILLER A.,	Hygiène et Education Sanitaire (T)	BOURDON R.,	Chimie Analytique
MOREAU R., +,	Pharmacie Chimique (T)	REYNAUD P.,	Pharmacie Chimique
GERMAN A.,	Virologie et Sérologie (T)	LE MOAN R.,	Toxicologie
PIETTE M., +,	Biologie Sanguine, Hématologie (T)	POISSON J.,	Pharmacie Galénique
MALANGEAU P.,	Chimie Analytique (T)	LECLERC M.,	Hématologie
GIRARD M., +,	Biologie Appliquée (T)	SAVEL J.,	Biologie Animale
DILLEMANN G.,	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)	PERCHERON F.,	Chimie Biologique

Maître de conférences

MM. PAOLETTI C.,	Toxicologie	MM. GUERNET M.,	Chimie Analytique et Bromatologie
DESVIGNES A.,	Cryptogamie et Technique Bactériologique	DIDRY J.,	Mathématiques
BORY M.,	Microbiologie	KHODADAD P.(F.F.)	Chimie Minérale et Minéralogie
MIOCQUE M.,	Chimie Organique	PERLES R. (F.F.)	Chimie Biologique
GUIGNARD J.L.,	Botanique Générale	YONGER J. (F.F.)	Chimie Analytique
GOUNELLE J.C.,	Physiologie	RIVET J. (F.F.)	Chimie Générale et Minérale
BINET P.,	Biologie Animale	HAZEBROUCQ (F.F.)	Physique
COMBET-FARNOUX C.,	Chimie Organique	ETIENNE J. (F.F.)	Mathématiques
Mme PLAT	Législation et Déontologie Pharmaceutique	MESTRE J. (F.F.)	Botanique
MM. DELACOUX E.,	Pharmacie Chimique	BOURRINET P. (F.F.)	Hygiène et Education Sanitaire
ADOLPHE C.,	Physique	SOULEAU Ch. (F.F.)	Chimie Générale et Minérale

Chefs de travaux pratiques

MM. AGNERAY J.,	T.P. Chimie Biologique 3è année	Melle JUND Y.,	C.E.S. Microbiologie
ASTIN C. (F.F.)	T.P. Physique 1ère année	MM. LALEGERIE P. (F.F.)	C.E.S. Biochimie
AYMARD P. (F.F.)	Physiologie	LAROCHE J.,	T.P. Physique 2ème Année
Melle BARNIER S. (F.F.)	Mathématiques	LEBOEUF M. (F.F.)	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galén
BERNARD J.,	T.P. Microbiologie	Mme. LEDUC Y.,	T.P. Chimie 4ème Année
M. BESANCON P. (F.F.)	Mathématiques	LEGER N.,	Parasitologie 4ème Année
Mme BIGET M.P. (F.F.)	Mathématiques	MM. LELUC R.,	T.P. Microbiologie 4ème Année
BLANC J.,	E.D. Chimie Organique	LEMONNIER A.,	T.P. Chimie Analytique Quantitative
BONALY J. (F.F.)	T.P. Botanique	LEVILLAIN P.,	E.D. Chimie Analytique
Melle BOURNIQUE C. (F.F.)	T.P. Physiologie Végétale 2ème année	LIKFORMAN J.,	E.D. Physique 1ère Année
MM. BRALET M. (F.F.)	T.P. Zoologie 1ère année	Melle LONGEVIALLE M.,	E.D. Botanique 1ère Année
CARLIER A.,	C.E.S. Pharmacie Galénique Industrielle	MM. MACCARIO J.,	Mathématiques 1ère Année
CARRE D. (F.F.)	Chaire de Physique (Mathématiques)	MAHUZIER G. (F.F.)	T.P. Chimie Analytique Qualitative
Mme CENAC J. (F.F.)	C.E.S. Parasitologie Pharmaceutique et Technique	MANDEREAU J.,	C.E.S. Pharmacotechnie Chimique et Galén
CHARPENTIER M.,	E.D. Chimie Minérale et Générale 1ère année	MARTIN FRERES H.,	T.P. Chimie Minérale 1ère Année
Melle CHOIX M.,	T.P. Pharmacie Galénique 3ème année	MAUGUEN Y.,	Chaire de Physique
CLAIR G. (F.F.)	E.D. Essais des drogues végétales	Melle MICHELET A. (F.F.)	E.D. Chimie Générale et Minérale 2ème Ann
MM. COMPAGNON P. (F.F.)	E.D. Chimie Organique	MORIN H.,	C.E.S. Pharmacodynamie et Essais Biologiq
DAGRON Ch.,	E.D. Chimie Générale et Minérale 2ème année		des Médicaments
DAVY J. (F.F.)	C.E.S. Biochimie	MM. MOULIN P. (F.F.)	T.P. Physique 1ère Année
Melle DECAUDIN M.Th.,	T.P. Parasitologie 4ème année	N'GUYEN PHU LICH (F.F.)	C.E.S. Toxicologie et Etudes Sanitaires
MM. DELCOURT A. (F.F.)	T.P. Botanique	Mme NOTTEGHEM J. (F.F.)	T.P. Zoologie 1ère Année
DREUX C.,	C.E.S. Electrochimie Appliquée à l'Analyse	MM. PARIS M.,	C.E.S. Contrôle des Médicaments (Biologi
Melle DUMANT G.,	C.E.S. Contrôle des Médicaments (Physico-Chimie)	PESTIS J.,	T.P. Anatomie et Physiologie 2ème Année
M. DUCLOS J.P.,	Chaire de Chimie Organique	POULLAIN P.,	C.E.S. Hématologie
Mme DUPONT Ch.,	T.P. Pharmacodynamie 4ème année	QUENEZ P.(F.F.)	Chaire de Chimie Générale et Minérale
M. ETIENNE G.,	T.P. Pharmacie Galénique 2ème et 3ème années	Mme ROBERT M.,	C.E.S. Immunologie Générale et Appliquée
Mme FAURE L., (F.F.)	E.D. Chimie Organique 1ère année	RODIER N. (F.F.)	T.P. Physique 2ème Année
Melle FLEURY S.,	E.D. Chimie Analytique Qualitative	Melle ROLLEN A.,	T.P. Botanique 1ère Année
FOGLIETTI A.M. (F.F.)	T.P. Chimie Biologique 3ème et 4ème années	M. ROUSSELET F.,	Biochimie Appliquée
M. GAYRAL P. (F.F.)	Zoologie 1ère année	Melle ROUSSELET R. (F.F.)	T.P. Essais des Drogues Végétales
Melle GOURSAT M.J. (F.F.)	E.D. Botanique 1ère année	Mme SEILLER M. (F.F.)	T.P. Pharmacie Galénique Industrielle
MM. HAMON M.,	T.P. Chimie Analytique Quantitative	Melle STRUPLER N.,	T.P. Chimie Générale et Minérale 1ère Ann
HARISPE J.,	T.P. Chimie Organique 2ème année	M. THUONG CONG TRIEU	T.P. Chimie Analytique Quantitative
HENRY J.,	T.P. Chimie 4ème année	Melle TROUPEL S. (F.F.)	T.P. Chimie Analytique Qualitative
Mme HUBERT J.,	C.E.S. Bactériologie Pharmaceutique et Technique	MM. VIERFOND J.M. (F.F.)	E.D. Chimie Organique 1ère et 2ème Année
M. JULIEN R. (F.F.)	E.D. Chimie Générale et Minérale	VILLERS J. (F.F.)	Physique

Bibliothèque

Melle RUYSSEN Y.	Conservateur en Chef +	Melle BOUVRESSE A.M.,	Bibliothécaire
Mme DESGRIPPES A.	Conservateur	Mme COULET M.A.,	Bibliothécaire

+ Légion d'Honneur
O Officier
C Commandeur

UNIV. LEIDEN BIBL.

A Monsieur le Professeur R. PARIS,
Chevalier de la Légion d'Honneur
Professeur de Matière Médicale à la Faculté
de Pharmacie de Paris,
qui m'a fait le grand honneur de présider le Jury de cette Thèse, mes remerciements respectueux.

A Monsieur le Professeur P. DELAVEAU

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris, qui a bien voulu s'intéresser à cette Thèse, m'a témoigné toujours beaucoup de bienveillance et m'a guidée tout au long de ce travail, ma gratitude et ma reconnaissance.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546008_0125

A Monsieur le Professeur J. L. GUIGNARD
Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris,
qui a accepté de participer au Jury de cette Thèse,
avec mes vifs remerciements

A mon père et à ma mère

A ma soeur

A mon mari et mes enfants

Avec toute ma grande affection.

PLAN DU TRAVAIL

Pages

INTRODUCTION 15

PREMIERE PARTIE : TRAVAUX ANTERIEURS

I - Caractères botaniques de la Bryone 17

a) Morphologiques 17
b) Microscopiques 18

II - Composition chimique 18

III - Propriétés pharmacologiques - Emplois 19

DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX PERSONNELS

- CHAPITRE I - ETUDE BIOCHIMIQUE DES FLAVONOIDES 23

I - Etude qualitative des polyphénols 23

1 - Recherches préliminaires 23
2 - Méthodes d'extraction des flavonoïdes 26

A - Essais sur la plante fraîche 26

- Extraction avec stabilisation 26

B - Essais sur la plante sèche 26

a) Essais préliminaires 27
b) Epuisement par solvants successifs 27
c) Extraction par l'alcool éthylique de différents titres 28
d) Extraction par l'alcool méthylique 28
e) Méthode choisie 28

II - Isolement des flavonoides 28

Pages

A - Extraction des flavonoïdes bruts 28

B - Fractionnement des divers flavonoïdes 29

a) Solubilités différentielles 29
b) Séparation par chromatographie sur colonne 29
- Colonne de cellulose 29
- Colonne de polyamide 30
c) Séparation par chromatographie préparative 30

III - Etude particulière des flavonoïdes 32

A - Flavonoïde A 32

a) Propriétés physiques 32
- Solubilités, point de fusion, pouvoir rotatoire ... 32
- Spectres ultra-violet, infra-rouge 33
- Chromatographie sur papier 34
b) Propriétés chimiques 34
- Réactions colorées 34
- Analyse élémentaire 34
- Essais d'hydrolyse 34
- Microdégradation alcaline..... 35
c) Structure 36

B - Flavonoïde B 36

a) Propriétés physiques 36
- Spectre ultra-violet 36
- Etude en chromatographie sur papier 37
b) Propriétés chimiques 37
- Réactions colorées 37

C - Flavonoïde A' et B'..... 37

- CHAPITRE II - DOSAGE DES FLAVONOIDES 39

I - Introduction 39
II - Méthodes d'extraction 39
III - Purification de l'extrait brut 41
IV - Dosage proprement dit 41

- CONCLUSION 44

- CHAPITRE III - REPARTITION ET EVOLUTION DES FLAVONOIDES 45

I - Introduction 45

Pages

II - Conditions de culture et étude de la germination des graines 45

III - Répartition des flavonoïdes dans les divers organes 47

A - Introduction 47

B - Recherches préliminaires 47

C - Etude de différents lots 49

D - Conclusion 62

IV - Variation des flavonoïdes en fonction des conditions de culture - influence de la lumière 62

A - Culture dans des conditions normales 63

B - Culture en phytotron 69

C - Plantules cultivées à l'obscurité 76

- CONCLUSIONS GENERALES 79

- INDEX BIBLIOGRAPHIQUE 83

INTRODUCTION

La Bryone dioique (*Bryonia dioica* Jacq.), Cucurbitacée indigène très commune, est anciennement connue pour les propriétés purgatives drastiques de sa racine. Celle-ci a été inscrite dans différentes Pharmacopées, mais son emploi en médecine humaine est aujourd'hui très réduit en raison de son action irritante.

La composition chimique très complexe de la racine a suscité des travaux récents : la structure d'hétérosides particuliers (bryoamaride, bryodulcoside) a été élucidée, montrant que les génines doivent être rattachées aux triterpènes tétracycliques comme les cucurbitacines.

Par contre, les parties aériennes de la Bryone ont été jusqu'à présent peu étudiées.

Au cours d'essais préliminaires effectués au Laboratoire de Matière médicale de la Faculté de Pharmacie de Paris, spécialisé depuis plus de vingt ans dans l'étude des dérivés polyphénoliques et en particulier des flavonoïdes, des pigments de ce genre furent mis en évidence en quantité notable dans les tiges feuillées de la Bryone.

Leur étude plus approfondie, tant au point de vue biochimique qu'en ce qui concerne leur métabolisme chez le végétal, me fut donc confiée par le Professeur PARIS et le Professeur DELAVEAU.

Avant d'aborder l'exposé de ce travail, je tiens à remercier Monsieur le Professeur R. PARIS d'avoir bien voulu m'accueillir au Laboratoire de Matière Médicale. Sa grande expérience scientifique et sa compétence dans le domaine de la biochimie des polyphénols m'ont aidée dans la réalisation de ce travail. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude pour le grand honneur qu'il m'a fait en acceptant de présider le jury de cette Thèse.

J'adresse mes remerciements les plus vifs à Monsieur le Professeur P. DELAVEAU, dont l'amical soutien ne m'a jamais fait défaut. Ses constants encouragements, les conseils qu'il m'a prodigués en me faisant bénéficier de sa propre expérience dans le domaine de la Physiologie végétale, m'ont permis de mener à bien cette thèse.

A Monsieur le Professeur J.L. GUIGNARD qui a accepté de juger ce travail j'adresse mes sincères remerciements.

Madame H. MOYSE, Assistante de la Chaire de Matière Médicale, m'a aidée dans la rédaction de ce travail avec beaucoup de patience et de bienveillance ; je tiens à l'en remercier et la prie de croire à ma sincère reconnaissance.

J'assure de mon amicale sympathie tous mes camarades du laboratoire.

Mes remerciements s'adressent aussi pour leur aide technique à Messieurs A. DANGEARD, R. VERGER et JOUHET.

PREMIÈRE PARTIE
TRAVAUX ANTÉRIEURS

I - CARACTERES BOTANIQUES DE LA BRYONE

a) Morphologiques

La Bryone, *Bryonia dioica* Jacq., est une des rares Cucurbitacées qui soit spontanée en France. Décrite dans les flores et des ouvrages classiques de Matière médicale, c'est une plante herbacée dioïque, vivace par une racine tubérisée et dont la tige peut atteindre 5 m de longueur.

La plante est couverte de poils tecteurs, courts, raides et renflés à la base.

La racine principale est très développée, charnue et cylindrique ("navet du diable"). Au printemps, apparaissent des bourgeons donnant naissance aux tiges florifères.

C'est une plante grimpante, munie de vrilles non ramifiées, contournées en hélices, opposées aux feuilles et qui sont elles-mêmes des feuilles modifiées.

Les feuilles inférieures de la plante et celles des pieds femelles sont à peine lobées. Les feuilles des pieds mâles sont en coeur à la base, pétiolées, simples, alternes et comportent 3 à 5 lobes aigüs, dentés.

Les fleurs mâles et femelles sont d'un jaune verdâtre ou blanc jaunâtre veinées. Les fleurs staminées sont groupées au sommet de rameaux florifères allongés, plus longs que la feuille, alors que les fleurs pistillées sont rassemblées sur des rameaux florifères courts.

Les fleurs mâles ont un calice en forme de cloche à 5 dents, une corolle formée de 5 pétales verdâtres soudés entre eux, 5 étamines dont 4 se soudent 2 à 2 ; anthères contournées en S non soudées.

Dans les fleurs femelles le périanthe est placé au-dessus de l'ovaire infère adhérent ; celui-ci formé de 3 carpelles est surmonté de 3 styles, cohérents en un seul dans leur partie inférieure, chacun étant terminé par un stigmate globuleux ou en forme de rein et poilu. L'ovaire est divisé en 3 loges contenant chacune 2 ovules anatropes.

Le fruit est une baie de 7 à 8 mm, globuleuse, lisse, verte puis rouge cerise à maturité, contenant jusqu'à 6 graines aplaties, sans albumen lorsqu'elles sont mûres.

La floraison a lieu de Mai à Août, puis les feuilles se fanent peu à peu tandis que les fruits mûrissent (de Juillet à Octobre).

- Distribution géographique

En France, la Bryone est très commune en plaine, surtout dans les régions septentrionales. Elle ne s'élève pas au-dessus de 1 400 m. On la rencontre également en Europe Centrale et Méridionale, dans l'Asie du Sud-Ouest et en Afrique du Nord.

A signaler qu'on rencontre en Europe et en Amérique septentrionales le *Bryonia alba* L, espèce monoïque à baies noires, dont la racine a des propriétés et des emplois analogues à ceux de la Bryone dioïque.

b) Microscopiques

Les caractères les plus intéressants, en dehors de l'existence de faisceaux libéro-ligneux bicollatéraux dans la tige et la racine, sont la présence d'un appareil secréteur constitué par des articles disposés en files et parfois ramifiés, que SACHS puis BRAEMER (1893) ont nommé *idioblastes*. C'est dans ces idioblastes à contenu jaune que BRAEMER localise la "bryonine", principe actif de la plante, par diverses réactions colorées (notamment coloration rouge sang par H_2SO_4 concentré).

D'autre part, il faut signaler le travail de DUFOUR (1886) sur la coloration bleue avec l'iode de l'épiderme foliaire de la Bryone (et d'autres plantes, dont l'Alliaire et la Saponaire (*)), qu'il attribue à l'existence d'un "amidon soluble" ; cette réaction est particulièrement nette avec les jeunes feuilles.

II - COMPOSITION CHIMIQUE

WEHMER (1931-1935) rapporte les premiers travaux sur la composition chimique de la Bryone : la racine renferme des glucides, une résine ("bryorésine") qui serait un mélange complexe, une huile fixe, des stérols ; la présence de saponines (bryonine de MASSON 1893) et d'un alcaloïde (POWER et MOORE 1911 , "bryonicine" de ZELLNER et TASCHNER 1927) a été également signalée.

Les parties aériennes sont riches en nitrate de potassium et renfermeraient aussi, d'après CHAZE (1932), une substance alcaloïdique. Les graines sont riches en huile et en protides, les baies mûres, rouges, sont colorées par du lycopène.

(*) Il faut remarquer que ces deux plantes renferment des C-flavonoïdes qui sont, sans doute, responsables de cette réaction.

Les travaux récents ont porté surtout sur les hétérosides des racines dont les génines sont maintenant rattachées aux triterpènes tétracycliques. Ont été isolés :

- un glucoside amer cristallisé, le *bryoamaride* (TUNMANN et WIENECKE 1960) hydrolysable par les acides et l'élatérase en glucose et génine proche de la cucurbitacine L ;

- un hétéroside sucré, le *bryodulcoside* hydrolysable par voie enzymatique en glucose et bryobioside qui donne lui même glucose, rhamnose et bryodulcosigénine en $C_{30}H_{50}O_4$ (TUNMANN et STAPEL 1966).

Par hydrolyse acide, on obtient les mêmes sucres et l'anhydrogénine correspondante, en $C_{30}H_{48}O_4$. Celle-ci s'est montrée identique à la bryogénine obtenue par BIGLINO (1959) et qui (BIGLINO, LEHN et OURISSON 1966) est un triterpène tétracyclique ayant le squelette des cucurbitacines, mais moins oxygéné.

S'il est vraisemblable que ces substances sont partiellement responsables des propriétés irritantes de la Bryone, il faut signaler qu'un polysaccharide agissant comme pyrogène, le bryopolyose a été séparé de la racine du *B. alba* espèce voisine du *B. dioica* (HAHN et Coll. 1963).

Les parties aériennes ont été moins étudiées : à mentionner la caractérisation de dérivés de l'asparagine (FOWDEN 1961) et, (selon BATE-SMITH 1962) d'acide caféique.

III - PROPRIETES PHARMACOLOGIQUES - EMPLOIS

La racine de Bryone a été inscrite à de nombreuses Pharmacopées ; officinale en France et en Espagne jusqu'en 1884, en Belgique jusqu'en 1885, aux Etats-Unis jusqu'en 1905, elle figure à la Vème édition de la Pharmacopée Mexicaine (1925).

La poudre (à la dose de 1 à 2 g) ou le décocté (à 10 pour 100) ont été surtout employés comme purgatif drastique. La drogue est à peu près abandonnée à cause de ses effets toxiques et de son action inconstante (BIGLINO 1959).

D'après GARNIER, BEZANGER-BEAUQUESNE et DEBRAUX (1961), elle continue encore à être utilisée en médecine populaire comme dépuratif et révulsif (racine fraîche).

En outre, la racine (ainsi que celle du *B. alba*), sous forme de teinture, fait partie de certaines préparations homéopathiques : gouttes et liniments utilisés dans les affections respiratoires et les rhumatismes.

En médecine vétérinaire, la poudre est employée comme expectorante. Les principes toxiques présents dans la racine et dans les baies provoquent de nombreux accidents chez l'enfant (une quinzaine de baies seraient mortelles) et, selon DERIVAUX-LIEGEOIS 1962, chez les volailles et chez le porc (racine).

DEUXIÈME PARTIE
TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I

ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES FLAVONOIDES

I - ETUDE QUALITATIVE DES POLYPHENOLS

Ces essais ont été effectués sur des tiges feuillées de plantes sauvages d'origines diverses (région parisienne).

Paris : Parc de Bagatelle (plantes grimpant le long d'Ifs) ;
Environs de Paris : Parc de Sceaux (d°) ;
d° : Bourg la Reine (plantes grimpant le long d'une clôture) ;
Région d'Enghien : (haie)
Région de l'Yonne : (Saint-Privé) (haie).

et sur des plantes cultivées au Jardin de la Faculté de Pharmacie de Paris.

1/ Recherches préliminaires

a) Recherche des flavonoïdes

Elle a été réalisée sur un infusé de tiges feuillées. (Il a été constaté que la racine ne contient pas de flavonoïdes). En présence de potasse alcoolique, l'infusé prend une teinte jaune. S'il est soumis à la réaction dite de la cyanidine (addition d'acide chlorydrique concentré et de magnésium), on observe l'apparition d'une coloration rouge orangé ("abricot") soutenue.

Avec une solution de chlorure ferrique à 2 pour 100, il y a apparition d'une coloration brun-gris.

Un extrait alcoolique obtenu par action de l'alcool éthylique bouillant pendant 30 minutes (5 g de tiges feuillées fraîches pour 100 ml d'alcool à 95°), et concentré ensuite au 1/5, est examiné en chromatographie (méthode ascendante) sur papier Whatman n° 1 (10 à 20 µl par tache) dans différents solvants S_1, S_1', S_2, S_2', (voir tableau I page 24).

La révélation est faite par observation en lumière ultra-violette (fluorescence) avant et après action des réactifs des flavonoïdes R_1, R_2, R_3 et R_4 (voir p.24). Les extraits traités ainsi permettent d'observer la présence de taches qui (Tableau II p. 24) sont considérées comme des flavonoïdes.

Tableau I

Composition des principaux solvants et réactifs de révélation utilisés

- SOLVANTS POUR CHROMATOGRAPHIE (proportions exprimées en volume)

S_1 : Alcool N butylique - acide acétique - eau : 4 - 1 - 5 (v/v) ;

S'_1 : Alcool N butylique - acide acétique - eau : 20 - 5 - 11 (v/v) ;

S_2 : Acide acétique - eau : 15 - 85 (v/v) ;

S'_2 : Acide acétique - eau : 60 - 40 (v/v) ;

S_3 : Acétate d'éthyle - acide formique - eau : 10 - 2 - 3 (v/v) ;

S_4 : Alcool isoamylique - hexane - acide acétique - eau : 3 - 1 - 3 - 3 (v/v).

- REVELATEURS

R_1 : Vapeurs d'ammoniac ;

R_2 : Solution alcoolique d'hydroxyde de potassium à 5 p. 100 (p/v) ;

R_3 : Solution alcoolique de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$, $5H_2O$) à 5 pour 100 (p/v) ;

R_4 : Solution alcoolique de chlorure ferrique ($FeCl_3$ à 1 p. 100) (p/v) ;

Tableau II

Chromatographie sur papier d'un extrait de tiges feuillées de Bryone

Taches observées	R_f dans divers solvants					Couleurs en présence de divers réactifs					Interprétation
						R_1 ou R_2		R_3		R_4	
	S_1	S_2	S'_2	S_3	S_4	visible	U.V	visible	U.V.	visible	
F A	0,35	0,60	0,82	0,39	0,14	Jaune citron	Jaune citron	Jaune clair	Jaune clair	Brun gris	Flavonoïde
F B	0,33	0,46	0,75	0,24		Jaune orangé	Jaune orangé	Jaune clair	Jaune soutenu	Brun	Flavonoïde
F A'	0,55	0,50	0,81	0,58		Jaune citron	Jaune citron	Jaune clair	Jaune clair	Brun gris	Flavonoïde
F B'	0,49	0,50	0,80	0,49		Jaune orangé	Jaune orangé	Jaune clair	Jaune soutenu	Brun	Flavonoïde

En première analyse, les feuilles de la Bryone ne semblaient contenir que deux flavonoïdes $F_v A$ et $F_v B$.

Pour rechercher la présence d'autres flavonoïdes, nous avons utilisé des solvants de chromatographie fournissant des R_f plus différentiels (Solvant S_3). Nous avons ainsi constaté la présence de deux substances supplémentaires A' et B', de nature supposée également flavonique, car elles présentent les mêmes colorations en lumière ultra-violette et en présence de potasse alcoolique et les R_f sont très proches.

Nous avons ensuite tenté l'isolement des divers constituants afin de les identifier et de disposer d'étalons pour les dosages.

b) Recherche des leucoanthocyanes

Elle a été faite par digestion de la poudre grossière de tiges feuillées de Bryone dans le propanol chlorhydrique, au bain marie, pendant 15 minutes. La réaction est négative, aucune coloration rouge n'étant apparue.

En chromatographie sur papier, en révélant par l'acide p. toluène sulfonique à 3 pour 100 dans l'alcool, la réaction est également négative (pas de coloration rouge violet).

c) Recherche des catéchols (catéchines)

Elle a été effectuée sur l'infusé à 10 pour 100 qui a été épuisé par l'éther, l'extrait éthéré a été évaporé à sec et le résidu repris par l'alcool à 95° ; après chromatographie sur papier dans le solvant S de cet extrait alcoolique, la révélation est faite par l'acide p. toluène sulfonique à 3 pour 100 dans l'alcool. La réaction est négative. (aucune coloration rouge ou ocre n'est apparue).

d) Recherche des tanins

Elle a été faite sur l'extrait alcoolique et sur l'infusé ; en présence de chlorure ferrique nous avons une coloration brun gris non caractéristique. L'infusé de tiges feuillées étant additionné du réactif de Stiasny (formol + HCl), on n'observe aucun précipité ; la recherche des tanins catéchiques est donc négative. En présence de gélatine salée à 1 pour 100, aucun précipité n'apparait, il n'y a donc pas de tanins.

e) Recherche des acides-phénols

Elle a été réalisée sur un décocté à 20 pour 100 de tiges feuillées de Bryone. Après filtration, la liqueur est épuisée à plusieurs reprises par l'éther éthylique ; la solution éthérée est évaporée à sec, le résidu est repris par 1 ml d'alcool à 95° ; la chromatographie de cette solution alcoolique a été effectuée en présence de témoins d'acides-phénols (acides caféique, chlorogénique, gallique) dans le solvant S_1, avec révélation par les UV, la potasse alcoolique et le chlorure ferrique.

Des taches fluorescentes peu intenses sont observées, dont une très faible au niveau de l'acide caféique, mais elles ne sont pas révélées par la potasse alcoolique ni par le chlorure ferrique. Après hydrolyse du décocté par l'acide sulfurique N pendant 10 minutes à l'ébullition, puis extraction par l'éther, une nouvelle chromatographie n'a pas donné de meilleurs résul-

tats. Il ne nous a donc pas été possible de caractériser l'acide caféique mis en évidence par BATE-SMITH (1962) dans les tiges feuillées de la Bryone.

En conclusion de ces recherches préliminaires, les flavonoïdes semblent les seuls composés polyphénoliques existant en quantité notable dans les tiges feuillées de la Bryone. Nous avons donc tenté d'isoler les divers flavonoïdes caractérisés en chromatographie sur papier.

2/ Méthodes d'extraction des flavonoïdes

A - Essais sur la plante fraîche - Extraction avec stabilisation.

● Mode opératoire - Nous avons utilisé la méthode générale de traitement par l'alcool bouillant de CHARAUX-PARIS qui associe stabilisation et épuisement de la plante.

Le rapport de la masse de la plante au volume du solvant doit être au minimum de 1/8. La durée de l'ébullition est de 1 heure. L'extrait alcoolique obtenu est séparé. Le résidu d'extraction est séché, broyé et une deuxième extraction a lieu. On réunit les deux extraits alcooliques.

Par distillation, sous pression réduite, l'alcool est entièrement éliminé ; le résidu aqueux est repris par de l'eau distillée bouillante (5 parties). La liqueur ainsi obtenue est filtrée, puis dégraissée par l'éther éthylique, et conservée sous le même solvant au réfrigérateur.

Au bout d'une dizaine de jours de séjour à + 4°C, les flavonoïdes bruts précipitent au fond du flacon sous forme de poudre grossière jaunâtre.

● Appareils utilisés - Pour des quantités de drogue fraîche de l'ordre de 500 g, l'appareil utilisé est constitué par un ballon en verre pyrex de 3 litres de capacité, surmonté d'un réfrigérant et chauffé par une résistance électrique à thermostat. Pour les quantités supérieures à 500 g, la stabilisation et l'extraction sont effectuées dans un appareil (type BOURQUELOT) en acier inoxydable comportant une cuve de 15 l chauffée par un bain-marie électrique et un couvercle type autoclave ; elle est reliée à un condenseur. Le fond de la cuve est garni d'un grillage ; un robinet permet de recueillir les liqueurs extractives.

B - Essais sur la plante sèche

L'extraction des flavonoïdes à partir du matériel séché peut offrir des avantages (encombrement réduit, possibilité d'emploi de solvants non miscibles à l'eau, extractions étalées dans le temps). Il faut donc au préalable vérifier que la dessiccation ne modifie pas la structure chimique des flavonoïdes présents. En effet, au cours de la dessiccation du matériel végétal, des altérations peuvent s'observer, telles que des hydrolyses enzymatiques (PARIS et DELAVEAU 1960, N'GUYEN HIEP, DELAVEAU et PARIS 1964).

Afin d'estimer ces altérations possibles, nous avons utilisé une méthode des "5 teintures" dérivée de celle des 3 teintures de N'GUYEN HIEP, DELAVEAU et PARIS (1964).

a) Essais préliminaires

Un même lot de tiges feuillées est divisé en 5 échantillons d'analyse de 2 grammes chacun.

- 1er échantillon : tiges feuillées séchées à la température ambiante pendant 8 jours ; extraction par l'alcool éthylique à 95° bouillant (100 ml).

- 2ème échantillon : tiges feuillées fraiches finement broyées au mortier ; macération dans l'eau additionnée de toluène, à 37°C pendant 15 heures.

- 3ème échantillon : tiges feuillées fraîches finement broyées ; macération dans l'alcool méthylique (100 ml), à 37°C pendant une nuit.

- 4ème échantillon : tiges feuillées stabilisées par l'alcool éthylique à 95° en présence d'une pincée de carbonate de calcium.

- 5ème échantillon : tiges feuillées stabilisées par l'alcool éthylique à 95° en présence d'une pincée de carbonate de calcium.

Lors de la chromatographie des 5 solutions extractives sur papier Whatman n° 1 dans le solvant S_1 (10 µl par tache), nous observons des taches identiques de flavonoïdes.

Les flavonoïdes de la Bryone ne sont pas fragiles et ne semblent donc pas subir de modifications notables lors de la conservation de la drogue.

b) Epuisement par les solvants successifs

Nous avons employé les différents solvants par ordre de spécificité décroissante : éther de pétrole, chloroforme, éther éthylique, acétate d'éthyle, acétone et alcool méthylique.

200 grammes environ de tiges feuillées séchées à l'air libre sont broyés et placés dans un appareil de Soxhlet. Chaque extraction est précédée d'une macération de 15 à 16 heures. L'épuisement qui suit dure 5 heures.

Entre deux épuisements successifs, le marc est séché à l'air. La présence des flavonoïdes dans les différentes fractions a été vérifiée par la réaction dite de la cyanidine et par chromatographie sur papier dans le solvant S_1 (révélateurs UV, KOH et $AlCl_3$).

L'acétate d'éthyle et l'alcool méthylique extraient la plus grande quantité de flavonoïdes.

Résultats de l'épuisement par les solvants successifs :

Solvants	Flavonoïdes
éther de pétrole	0
chloroforme	traces
éther éthylique	0
acétate d'éthyle	++
acétone	++
alcool méthylique	+++

La présence des flavonoïdes est appréciée par la réaction de la *"cyanidine"* et par chromatographie des extraits dans le solvant S_1.

c) Extraction par l'alcool éthylique de différents titres

Extraction effectuée sur 5 g de poudre de tiges feuillées sèches ; trois extractions successives avec 100 ml d'alcool éthylique à 95° à l'ébullition, sous réfrigérant à reflux, sans presser ni essorer le marc.

Les chromatographies des solutions extractives ont montré que ce mode d'épuisement est insuffisant, car le dernier marc contient encore des flavonoïdes.

Des extractions par l'alcool éthylique à 80°, à 60° et à 40° ont été réalisées dans les mêmes conditions ; l'alcool éthylique à 40° semble réaliser la meilleure extraction.

d) Extraction par l'alcool méthylique

Cette extraction, effectuée dans les mêmes conditions que les précédentes, nous a donné les meilleurs résultats. Car même si la solution extractive est relativement moins riche en principes actifs, ces derniers sont obtenus sous une forme plus pure qu'avec l'alcool éthylique à 40°, et l'élimination du solvant est plus facile, étant donné son point d'ébullition plus bas.

e) Méthode choisie

Les meilleurs résultats sont obtenus par l'extraction de 1 Kg de drogue sèche au moyen de 10 litres d'alcool méthylique dans l'appareil à stabiliser précédemment décrit.

Le rendement est augmenté en utilisant uniquement les feuilles de Bryone débarrassées des tiges, car les limbes foliaires sont les plus riches en flavonoïdes (5 g de produit brut pour 1 Kg de feuilles).

II - ISOLEMENT DES FLAVONOIDES

A - Extraction des flavonoïdes bruts

L'extraction est réalisée à partir de plantes récoltées en Mai et Juin.

Le matériel sec (1 Kg de feuilles) est épuisé par l'alcool méthylique à l'ébullition. Après élimination complète du solvant par distillation sous pression réduite, le résidu obtenu est repris par l'eau bouillante (500 ml).

L'extrait aqueux est alors filtré, puis purifié par plusieurs traitements par l'éther éthylique (100 ml).

Au cours du séjour au réfrigérateur, il se forme un précipité cristallin de couleur gris jaune. Celui-ci est séparé par centrifugation, lavé à l'eau et séché (5 g de précipité brut). Ce produit est recristallisé dans l'alcool à 40°.

B - Fractionnement des divers flavonoïdes

Ce précipité est étudié par chromatographie sur papier dans les solvants déjà cités.

Dans les solvants S_1 et S_1', nous avons mis en évidence la présence de deux flavonoïdes A et B. Le solvant S_3 nous a permis de déceler la présence de deux taches supplémentaires présentant les caractéristiques de substances flavoniques : A' et B'.

Le flavonoïde A est le plus abondant. Il représente environ les 2/3 du précipité brut. Le reste est constitué par du FvB et en proportion moindre par FvA' et FvB'.

Les solubilités sont très voisines, d'où de grandes difficultés pour séparer B de B' et A' de A.

a) Essais de solubilités différentielles

0,20 g de précipité est mis dans une quantité de solvant telle que la majeure partie soit dissoute à l'ébullition. On filtre bouillant et on laisse reposer à la température du laboratoire.

Lors de la formation d'un précipité, on le centrifuge puis on analyse par chromatographie précipité et surnageant. Nous avons ainsi essayé :

- l'alcool éthylique à des titres variant de 20° à 96° ;
- l'alcool butylique normal ;
- le dioxane ;
- le diméthyl formamide ;

L'alcool éthylique à 30° ainsi que le dioxane nous ont permis d'obtenir FvA à un degré de pureté avancée ($\#$ 95 pour 100). Mais un produit tout à fait pur n'a pu être obtenu par cette méthode. Il reste toujours des traces de FvB dans le précipité. Quant aux liqueurs mères, elles contiennent toujours les deux flavonoïdes en quantité importante, car FvA est beaucoup plus abondant que FvB.

b) Séparation par chromatographie sur colonne

Colonne de cellulose - 40 g de cellulose en poudre DURIEUX sont introduits dans une allonge cylindrique en verre de 55 x 1,5 cm, munie d'un robinet ; 5 cg de précipité brut sont dissous dans le minimum d'alcool méthylique. La solution est versée au sommet de la colonne.

L'élution est faite successivement par de l'eau, de l'acool à différents titres, et le solvant de Partridge (phase aqueuse et phase organique qui fournissent une bonne séparation en chromatographie sur papier).

Avec ces différents solvants, le flavonoïde A pur a été obtenu seulement avec un faible rendement. Quant aux autres substances flavoniques, elles n'ont pu être séparées.

● Colonne de polyamide - Nous avons utilisé le polyamide technique de WOELM pour chromatographie. Dans une fiole conique de 300 ml, 30 g de polyamide sont lavés à l'eau distillée chaude (200 ml - température maximale 50°C) à plusieurs reprises et en agitant. Les 2/3 de la suspension liquide sont versés dans une allonge de 35 x 2,5 cm munie d'un robinet. On tasse légèrement l'adsorbant en s'aidant du vide. 5 cg de précipité en suspension dans l'eau avec la moitié du polyamide qui reste sont versés avec précaution sur la colonne, enfin le tout est recouvert de polyamide. On lave ensuite à l'eau distillée (100 ml) et on élue par l'alcool éthylique de titres croissants. Nous avons séparé des fractions contenant FvA en solution concentrée mais une solution pure de FvA n'a pu être obtenue. Quant à FvB, il a été impossible de l'éluer de la colonne.

c) Séparation par chromatographie préparative sur papier et sur plaque

Pour obtenir des substances rigoureusement pures, nous avons donc dû employer la chromatographie d'élution sur papier et sur plaque.

● Chromatographie préparative (méthode descendante) sur papier (selon B.H. KOEPPEN 1964)

Le papier Whatman MM n° 3, préalablement lavé à l'eau distillée et séché, est utilisé en feuilles de 42/46 cm et 28/40 cm, dont le bas est découpé en dents.

On dépose sur chaque feuille, en ligne continue, 5 ml d'une solution alcoolique du produit brut de concentration 0,16 g pour 100. La migration qui dure 16 heures se fait dans des cuves Shandon avec le solvant S_1'.

Le papier est séché et les taches de flavonoïdes sont révélées au moyen des rayons U.V.

Nous observons deux bandes correspondant à FvA et à FvB. Les bandes sont découpées puis pulvérisées au "mixer". Avec la poudre obtenue, on réalise une colonne.

L'élution se fait par l'alcool éthylique à 70 pour 100. L'éluat est concentré à l'évaporateur rotatif. Au bout de quelques jours, un précipité apparaît dans chacune des solutions correspondant respectivement à FvA et FvB.

La pureté des produits obtenus est vérifiée par chromatographie sur papier sans le solvant S_1.

● Chromatographie préparative sur plaque de cellulose (Adsorbant : cellulose MACHEREY-NAGEL)

Sur couche mince de cellulose les 4 flavonoïdes de la Bryone sont bien séparés dans le solvant S_3 (acétate d'éthyle, acide formique, eau : 10-2-3 v/v) (fig. 1). Nous avons donc appliqué cette technique en chromatographie préparative.

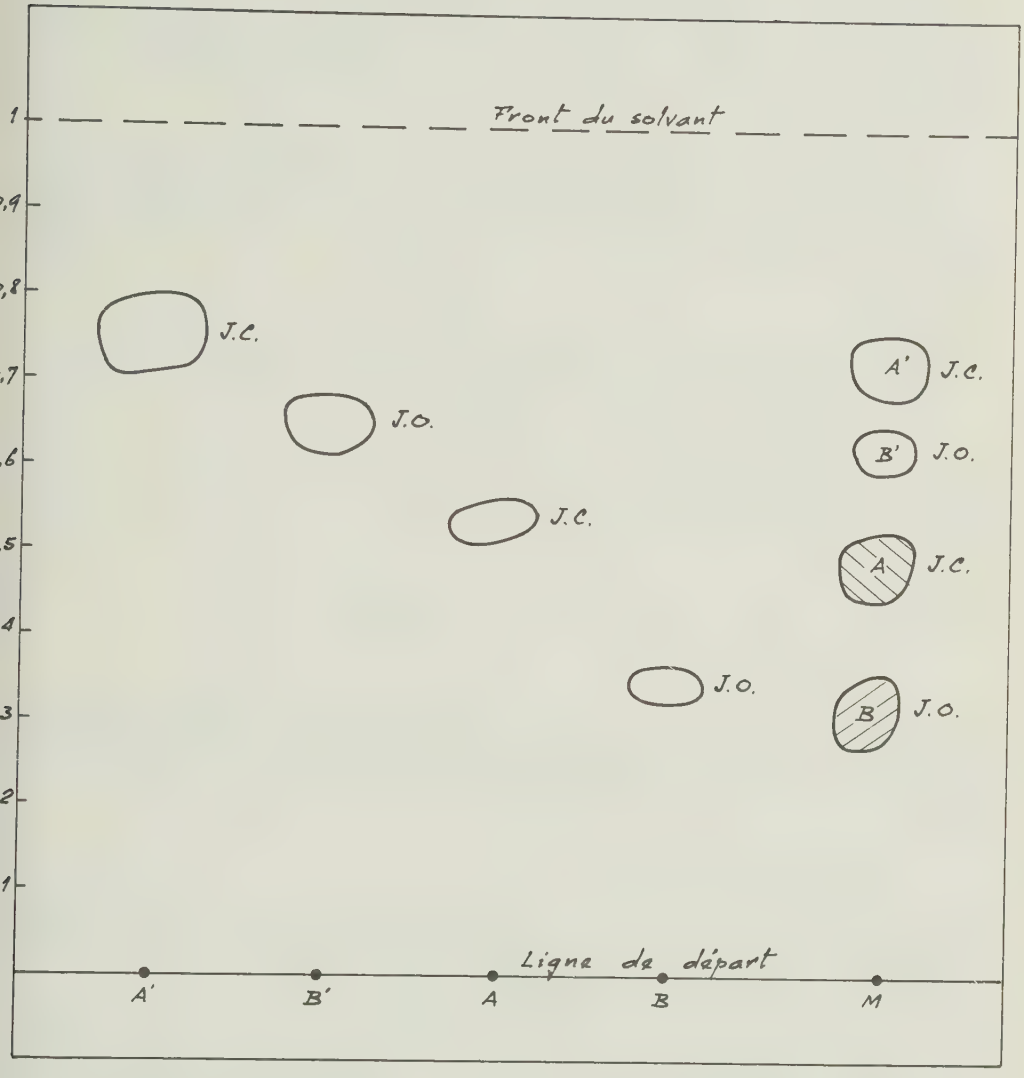


Figure 1 - Séparation des flavonoïdes de la Bryone par chromatographie sur couche mince.
Absorbant : cellulose M.N (0,25 mm d'épaisseur)
Solvant : S_3
Durée de migration : 1 h 30 mn
Révélateur : potasse alcoolique
M : extrait alcoolique de Bryone
A, B, A', B' : flavonoïdes purs en solution alcoolique.

Les plaques utilisées pour la chromatographie préparative ont une épaisseur de 0,50 mm. La solution des flavonoïdes bruts (0,16 g pour 100) dans l'alcool à 70 pour 100 est déposée en bandes à 3 cm du bord de la plaque (0,75 ml par plaque de 20/20 cm), à l'aide d'une pipette. Le développement se fait dans le solvant S_3 pendant 3 heures à 20°C.

Après séchage, les plaques sont examinées à la lumière U.V. On observe la présence de 4 bandes correspondant aux 4 substances B, A, B' et A' (dans l'ordre de migration), le flavonoïde A étant le plus abondant. La poudre de cellulose est séparée par grattage au niveau de ces 4 bandes, chaque fraction est introduite dans un flacon contenant de l'alcool éthylique à 70 pour 100.

L'élution se fait par simple agitation à froid. Après centrifugation et filtration sur papier, sont obtenues les solutions des 4 flavonoïdes.

Par évaporation à sec de la solution de B', on obtient une substance résineuse impossible à purifier.

Pour A', la solution est très peu concentrée et il se forme une fine pellicule sur les parois du ballon.

III - ETUDE PARTICULIERE DES FLAVONOIDES

A - Flavonoïde A

Il se présente sous forme d'une poudre microcristalline jaune pâle. FvA semble 3 fois plus abondant que FvB. Obtenu directement à partir du précipité brut ou par chromatographie préparative, il est purifié par recristallisation dans l'alcool éthylique à 40°.

a) Propriétés physiques

Peu soluble dans l'alcool éthylique à 96°, il est assez soluble dans l'alcool à 70° ainsi que dans l'alcool méthylique à 70 pour 100, peu soluble dans l'acétone et l'eau froide ; peu soluble dans l'acétate d'éthyle, il est insoluble dans l'éther de pétrole et le chloroforme.

Après dessiccation sous pression réduite à la température d'ébullition du xylène (137°C) pendant 6 heures, FvA présente un point de fusion instantané de 260°C (bloc Maquenne), 240°C (microscope à platine chauffante de Reichert), 230°C (en tube capillaire fermé). La détermination du pouvoir rotatoire a été faite sur une solution à 1 pour 100 dans la pyridine. La dissolution se fait à chaud. La solution est jaune. Déviation lue $\alpha = -0,36°$ (tube de 5 cm) :

d'où

$$[\alpha]^D = \frac{-0,36 \times 100}{0,5 \times 1} = -72°$$

Spectre ultra-violet (tableau III) - Les flavonoïdes, en général, présentent une absorption en lumière ultra-violette (JURD-GEISSMAN 1962 ; HARBORNE 1964) ; on peut observer des maximums caractéristiques dont deux principaux se déplaçant plus ou moins par addition de sels. En solution alcoolique à 1 pour 50 000, le spectre de FvA en lumière ultra-violette présente deux maximums à 270 et 335 nm. En présence de $AlCl_3$ (2 ml de solution de FvA et 2 ml d'une solution de $AlCl_3$ à 50 mg pour 50 ml d'alcool distillé sur grenaille de zinc et sur potasse), il y a un dédoublement de chacun des pics : 385 - 340 nm pour le pic I et 300 - 280 nm pour le pic II, en même temps qu'un déplacement (effet bathochrome ce qui est en faveur d'un OH libre en 5 (tableau III).

En présence d'hydroxyde de sodium (2 ml de solution alcoolique de FvA additionnée de 2 ml de solution alcoolique d'hydroxyde de sodium, à 20 mg pour 50 ml), nous avons un déplacement à 395 et 275 nm. En présence d'acétate de sodium (sol. alcoolique à 20 mg pour 50 ml), nous avons un déplacement à 400 nm, l'autre pic restant inchangé à 270 nm. L'acétate de sodium en présence d'acide borique ne donne aucun déplacement (pas d'OH vicinaux).

Spectre infra-rouge - Le spectre a été déterminé avec le produit purifié en suspension dans le Nujol. On remarque plusieurs bandes d'absorption :

3 microns : hydroxyle phénolique,

6 microns : carbonyle,

6,2 microns : noyau phényle,

10,1 ; 10,9 microns : chaîne hydroxylée,

12,8 microns : noyau aromatique substitué,

13,8 microns : noyau benzénique.

Tableau III

Pics d'absorption UV de FvA et FvB en présence de divers réactifs (Appareil BECKMAN D. B.)

Flavonoïdes	FvA		FvB	
Alcool neutre	I 335 nm	II 270 nm	I 350 nm	II 270 nm
+ Hydroxyde de sodium	395 nm	275 nm	405 nm	275 nm
Acétate de sodium	400 nm	270 nm	405 nm	272 nm
Acétate de sodium en présence d'acide borique	335 nm	270 nm	350 nm	265 nm
$AlCl_3$	385-340 nm	300-280 nm	390-350 nm	300-280 nm

● Etude en chromatographie sur papier - Le produit en solution alcoolique à 1 pour 100 dans l'alcool éthylique à 70° a été soumis à la chromatographie ascendante dans différents solvants.

On opère sur papier Whatman n° 1 avec des taches de 10 µl, température 20 ± 1°C.

Le Rf est mesuré pour le centre de la tache.

Les Rf respectifs sont les suivants : (moyenne de 5 résultats)

0,35 avec le Solvant S_1

0,60 avec le Solvant S_2

0,82 avec le Solvant S'_2

0,39 avec le Solvant S_3

0,14 avec le Solvant S_4

b) Propriétés chimiques

Analyse élémentaire - Elle a été effectuée sur le produit séché sous vide en présence d'anhydride phosphorique. Les résultats sont les suivants :

C : 50,52 ; H : 5,57 pour 100

Calculé pour $C_{21}H_{20}O_{10}$, $3H_2O$: C : 51,80 ; H : 5,39 pour 100

● Réactions colorées - L'acide sulfurique concentré provoque l'apparition d'une fluorescence jaune ; en présence d'alcali, il y a une coloration jaune intense ; une fluorescence brune avec le chlorure ferrique ; jaune orange avec l'acide chlorydrique et la magnésium (réaction dite de la "cyanidine", la coloration obtenue étant en faveur d'un composé du groupe des flavones).

L'addition à des cristaux de FvA d'anhydride acétique et d'acide sulfurique fait apparaître une fluorescence bleu-violet.

● Essais d'Hydrolyse acide - 1 mg de FvA est mis en présence de 1 ml d'acide sulfurique à diverses concentrations : N, 4N, 6N. On maintient au bain-marie bouillant pendant 6 heures. Des prélèvements sont effectués toutes les heures.

On neutralise par l'ammoniaque et on recherche par chromatographie sur papier, dans le solvant S_1, l'apparition des produits d'hydrolyse. Il n'y a pas formation de sucre et de génine, aucune tache supplémentaire n'apparait. Ceci laisse supposer que FvA est un C-hétéroside difficilement dédoublable ou une génine.

● L'hydrolyse oxydante - employée pour les C-hétérosides (J.W. FAIRBAIRN et S. SIMIC 1963) a permis d'obtenir une génine. La substance est traitée

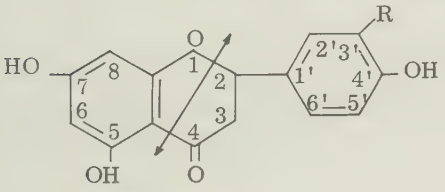
pendant 4 heures au bain-marie bouillant par de l'acide chlorydrique 4N contenant 4 pour 100 de chlorure ferrique.

Après refroidissement, on épuise par l'éther, celui-ci est évaporé à sec. Le résidu lavé à l'eau est repris par de l'alcool méthylique. La solution ainsi obtenue est mise en chromatographie en présence de témoins de génines flavoniques, l'apigénine et la lutéoline. On peut identifier le produit obtenu à l'apigénine (Rf 0,87 dans le solvant S_1, dans le solvant S_2 : Rf 0,65).

● La microdégradation alcaline est une méthode classique d'étude de la structure des flavonoïdes (R. PARIS et A. STAMBOULI 1961). Par fusion alcaline avec la potasse à chaud, il y a formation d'un phénol provenant du noyau chromone et d'un acide aromatique provenant du noyau aromatique latéral.

- Avec l'apigénine (5 - 7, 4' trihydroxyflavone) on a formation de phloroglucinol et d'acide p-hydroxybenzoïque.

- Avec la lutéoline (5 - 7, 3', 4' tétrahydroxyflavone) on a formation de phloroglucinol et d'acide protocatéchique.



R = H : apigénine
R = OH : lutéoline

Technique utilisée - Le produit A est dégradé par une semi-micro méthode.

Dans un creuset en acier inoxydable, 20 mg sont additionnés de 1 à 2 g de potasse et de quelques gouttes d'eau. On chauffe au four à moufle 4 minutes à 280°C.

Après refroidissement à l'air, on reprend par environ 5 ml d'eau distillée ajoutée goutte à goutte. On transvase dans un bécher, neutralise puis acidifie nettement par H_2SO_4 concentré. La solution est versée dans une ampoule à décanter et épuisée par quelques ml d'éther éthylique à trois reprises. On extrait ainsi le phénol et l'acide-phénol formés.

Les solutions éthérées réunies sont séchées sur sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées. Le résidu est repris par 0,5 ml d'alcool méthylique et la solution est soumise à la chromatographie sur papier.

On effectue des dépôts de 10 µl de cette solution et de 5 µl de solution à 0,5 pour 100 de témoins de phénols (phloroglucinol et résorcinol) et d'acides-phénols (acides protocatéchique, p-hydroxybenzoïque et gallique).

La solution donne deux taches : une de même coloration et au même niveau que la phloroglucinol (rouge brique) et une autre correspondant à l'acide p-hydroxybenzoïque (pourpre) (les révélateurs utilisés sont la benzidine diazotée et la p-nitraniline).

c) Structure

La résistance à l'hydrolyse acide normale révèle l'impossibilité de rompre la liaison sucre aglycone qui n'est donc pas une liaison semi-acétalique, mais une liaison C-C caractéristique des C-glucosides, rompue seulement par hydrolyse oxydante.

Pour FvA, les deux maximums situés à 270 et 340 nm le rapprochent de l'apigénine ou 5, 7, 4' trihydroxyflavone.

Les déplacements en présence de chlorure d'aluminium, acétate de sodium et hydroxyde de sodium (voir Tableau III) confirment l'existence d'hydroxyles libres en 5 et 4'.

La fluorescence bleu-violet qui apparait en présence d'anhydride acétique et d'acide sulfurique se produit également avec d'autres C-hétérosides ; saponarine et saponarétine ou isovitexine, mais elle est négative avec l'orientine, l'homo-orientine et l'apigénine, (PARIS et ETCHEPARE 1967).

La chromatographie, en présence de témoins, de la solution méthanolique du produit résultant de l'hydrolyse oxydante (page 25) indique la présence d'apigénine.

FvA apparait donc comme un C-hétéroside dérivé de l'apigénine. Il avait d'abord été dénommé bryoflavonoside (PARIS, DELAVEAU, LEIBA, 1966), mais, par ses caractéristiques physiques et chimiques, FvA parait identique à l'alliaroside isolé par R. PARIS et P. DELAVEAU (1962), de *l'Alliaria officinalis* (Crucifères).

B - Flavonoïde B

La substance est peu abondante dans la plante et nous avons rencontré beaucoup de difficultés pour l'avoir à l'état pur. FvB a été obtenu uniquement par chromatographie préparative.

La concentration des éluats alcooliques fournit une poudre grisâtre amorphe.

a) Propriétés physiques

Le spectre d'absorption en lumière ultra-violette, effectué dans les mêmes conditions que pour FvA, présente deux maximums à 350 et 270 nm ; en présence de $AlCl_3$ (mêmes conditions que pour FvA) les deux pics sont dédoublés et déplacés à 390 - 350 nm et à 300 et 280 nm (voir Tableau III) (OH libéré en 5).

En présence d'hydroxyde de sodium, nous obtenons un déplacement des deux pics à 505 nm et à 275 nm.

En présence d'acétate de sodium, les deux pics sont déplacés à 405 et 272 nm.

En présence d'acétate de sodium et d'acide borique, les deux pics se trouvent à 350 et 260 nm.

En présence d'anhydride acétique et d'acide sulfurique, on n'obtient pas de fluorescence violacée.

Ces différents caractères font penser que le flavonoïde B est un dérivé de la lutéoline ou 5 - 7 - 3' - 4' tétrahydroxyflavone, appartenant donc à la série de l'orientine.

Etant donné la faible quantité isolée, il n'a pas été possible de procéder, ni à une hydrolyse, ni à la fusion alcaline qui auraient permis de préciser la structure.

● Etude en chromatographie sur papier - La solution alcoolique (alcool éthylique à 70 pour 100) a été soumise à la chromatographie ascendante dans les mêmes solvants et dans les mêmes conditions que le flavonoïde A.

Les Rf respectifs sont les suivants : (moyenne de 5 résultats) :

0,33 avec le Solvant S_1

0,46 avec le Solvant S_2

0,75 avec le Solvant S'_2

0,24 avec le Solvant S_3

b) Propriétés chimiques :

Réactions colorées - En présence d'alcalis, apparition d'une teinte jaune ; avec le chlorure d'aluminium, coloration jaune vert dans le visible, plus intense en lumière U.V. ; avec l'acide chlorhydrique et le magnésium, coloration jaune rose ; en remplaçant le magnésium par le zinc, aucune coloration n'apparait.

C - Flavonoïdes A' et B'

Ces substances n'ont été obtenues que par chromatographie préparative sur plaque et seulement en solution.

● Flavonoïde A' - Il a été dénommé ainsi à cause de la coloration jaune citron observée en lumière U. V. après pulvérisation avec la potasse alcoolique, très voisine de celle du flavonoïde A.

Propriétés physiques - Le spectre d'absorption en lumière ultra-violette, effectué dans les mêmes conditions que pour FvA, présente deux maximums à 320 et 272 nm ; en présence de chlorure d'aluminium (mêmes conditions que pour FvA) le premier pic est dédoublé et déplacé à 378 et 338 nm. Le deuxième pic est triple et déplacé à 300 - 280 - 250 nm.

En présence d'hydroxyde de sodium, nous obtenons un déplacement des deux pics à 350 et 270 nm.

En présence d'acétate de sodium seul, le deuxième pic est déplacé à 270 nm ; de même pour l'acétate de sodium en présence d'acide borique.

Etude en chromatographie sur papier - Dans les mêmes conditions que précédemment, les Rf respectifs sont les suivants :

0,55 dans le Solvant S_1

0,50 dans le Solvant S_2

0,81 dans le Solvant S'_2

0,58 dans le Solvant S_3

Réactions colorées - En présence d'alcalis, apparition d'une coloration jaune soutenue, avec le chlorure d'aluminium la teinte est jaune vert pâle.

L'acide chlorhydrique, en présence de magnésium ou de zinc ne donne aucune coloration.

● Flavonoïde B' - Il a été dénommé ainsi à cause de la coloration jaune orange, très voisine de celle de FvB, observée en lumière ultra-violette après pulvérisation avec la potasse alcoolique.

Propriétés physiques - Le spectre d'absorption en lumière ultra-violette, effectué dans les mêmes conditions que pour FvA, présente deux maximums à 330 et 270 nm ; en présence de chlorure d'aluminium (mêmes conditions que pour FvA) les deux pics sont dédoublés et déplacés à 380 et 340 nm et à 300 et 270 nm (tableau III).

En présence d'hydroxyde de sodium, on obtient un déplacement des deux pics à 395 et 280 nm ; en présence d'acétate de sodium les deux pics sont déplacés à 395 et 330 nm ; en présence d'acétate de sodium et d'acide borique, il n'y a aucun déplacement.

Etude en chromatographie sur papier - Dans les mêmes conditions que pour FvA, les Rf respectifs sont les suivants :

0,49 dans le Solvant S_1

0,50 dans le Solvant S_2

0,80 dans le Solvant S'_2

0,49 dans le Solvant S_3

Réactions colorées - En présence d'alcalis, apparition d'une coloration jaune soutenue, avec le chlorure d'aluminium teinte jaune vert pâle, jaune très légèrement rose avec l'acide chlorydrique et le magnésium. L'addition d'anhydride acétique et d'acide sulfurique fait apparaitre une coloration passant au vert en lumière ultra-violette.

Les flavonoïdes A' et B' n'existent qu'à l'état de traces dans la plante ; nous n'avons pu les obtenir en quantité suffisante pour en approfondir l'étude.

CHAPITRE II

DOSAGE DES FLAVONOIDES

I - INTRODUCTION

En France, PARIS et CORNILLEAU (1954), ROUZET (1961) ont consacré des recherches aux méthodes analytiques permettant l'identification et le dosage des diverses catégories de flavonoïdes. En fait ce sont les flavonols à l'état d'aglycone ou d'hétéroside qui ont fait l'objet de la plupart des publications (DELAVEAU 1966).

Dans le cas de la Bryone, il s'agit en fait de C-hétérosides de flavones pour lesquels il paraissait, *a priori*, avantageux d'essayer deux méthodes éprouvées au Laboratoire de Matière Médicale, selon des procédés déjà appliqués à des flavonols :

1/ la densitométrie des taches de chromatographie ou d'électrophorèse (PARIS et FAUGERAS 1960)

2/ la spectrophotométrie des chélates flavonoïdes-aluminium (DELAVEAU 1967)

En fait, il faut distinguer trois temps : l'extraction des flavonoïdes à partir des organes à examiner ; la purification de l'extrait obtenu ; enfin le dosage proprement dit.

II - METHODES D'EXTRACTION

Il a été montré qu'en cours de la dessiccation des organes frais, aucune modification qualitative des flavonoïdes n'était observée chez la Bryone.

D'autre part, nous avons estimé que dans des conditions opératoires identiques, l'erreur portant sur d'éventuelles modifications quantitatives au cours de la dessiccation était réduite.

Le matériel récolté est aussitôt séparé, pesé (pour déterminer le poids sec) et mis à sécher à l'air, à la température du laboratoire, en couche mince. Toutefois, dans le cas des plantules, il est plus commode de mener l'extraction sur du matériel frais.

- Procédés d'extraction : Appareils et solvants :

a) Extraction au micro-extracteur-perforateur de laboratoire "BBS" (Etablissements BERCAUVERRE)

L'extraction se fait à niveau constant à travers une plaque de verre fritté, de porosité déterminée. Le niveau d'écoulement du solvant est réglable à volonté. Nous avons opéré avec des organes secs. 2 g de limbes sont broyés au mortier de façon à obtenir une poudre grossière avec laquelle on charge la cartouche de l'appareil. L'extraction se fait avec 50 ml d'alcool méthylique. Ebullition pendant deux heures.

L'extraction au "BBS" est meilleure que l'extraction en ballon à reflux et plus régulière. Elle est plus rapide pour une seule extraction. Seulement, étant donné que nous ne pouvions disposer que d'un seul appareil, le rendement est mauvais.

- Durée de l'extraction au "BBS" :

  Broyage + extraction ⟶ 3 heures pour *1* extraction

- Durée de l'extraction en ballon, avec ébullition à reflux

  Broyage + extraction ⟶ 3 heures pour *5* extractions

b) Extraction à reflux en ballon

● Choix de l'alcool - Les solvants suivants ont été essayés comparativement :

- l'alcool éthylique à 96° et 70°
- l'alcool méthylique pur et à 70 pour 100

On opère sur des lots de limbes secs de 2 g environ. Après plusieurs expériences, l'alcool méthylique a été choisi : son pouvoir dissolvant est meilleur pour les flavonoïdes, et son point d'ébullition relativement peu élevé permet une élimination facile lors de la concentration.

Les conditions opératoires sont :

● Nombre d'extractions : l'efficacité de l'extraction a été étudiée de la façon suivante : un même échantillon de limbes est soumis à trois extractions successives. Les extraits alcooliques convenablement concentrés et purifiés sont examinés par chromatographie sur papier, et soumis à un dosage spectrophotométrique. Les résultats sont reportés dans le Tableau IV page 41 . Pour un même lot, les résultats sont assez variables, c'est pourquoi nous avons trouvé que trois extractions étaient nécessaires lorsqu'il n'y a pas expression du marc entre chaque opération ; le 3ème résidu d'extraction ne contient pratiquement plus de flavonoïdes.

Tableau IV

Teneur en flavonoïdes des trois extraits préparés successivement à partir d'un même échantillon, exprimée en taux pour 100 d'extraction

N° d'ordre des extractions successives	1	2	3	4	5
1ère	82,3	85,6	75	89	75
2ème	16	12,5	21	8,9	20,5
3ème	2	1,7	3,6	1,7	4,4
Total	100,3	99,8	99,6	99,6	99,9

• Durée de l'extraction - nous avons fixé la durée de chaque extraction à 30 minutes.

c) Méthode utilisée

L'organe étudié (2 g environ), séparé de la plante, est pesé, puis introduit dans un ballon de 250 ml contenant de l'alcool méthylique bouillant et surmonté d'un réfrigérant à reflux.

Après 30 minutes d'ébullition, l'extrait alcoolique est séparé et l'organe partiellement épuisé est broyé au mortier, puis extrait à nouveau 30 minutes par 50 ml d'alcool méthylique. L'extrait alcoolique est séparé et on effectue une troisième extraction par l'alcool méthylique (50 ml) pendant 30 minutes. Les extraits filtrés sont réunis.

III - PURIFICATION DE L'EXTRAIT BRUT

La concentration de la solution extractive à un certain volume (10 ml) qui élimine l'alcool, provoque une précipitation de la chlorophylle. Ce précipité entraine des flavonoïdes dont la présence a été mise en évidence par chromatographie sur papier dans le solvant S_1 d'une solution de ce précipité.

Nous sommes donc obligés d'évaporer à sec sous vide à une température < 90°C. Le résidu est repris par un volume fixé d'alcool éthylique à 70°. Dans ces conditions, nous obtenons une solution extractive privée de chlorophylle et de carotènoïdes.

IV - DOSAGE PROPREMENT DIT

A - Densitométrie

Inspirée des travaux de PARIS et FAUGERAS (1955-1960) et de ceux de TROYER (1956), la densitométrie des taches de chromatographie nous permet de mesurer directement l'absorption en lumière ultra-violette. L'appareil utilisé est un densitomètre VERNON qui donne un enregistrement automatique.

● Choix du solvant de chromatographie - Nous avons choisi le solvant S_3 (acétate d'éthyle, acide formique, eau (10-2-3) monophasique qui donne une bonne séparation des taches dans un temps relativement court : 4 heures à 20°C.

● Choix du papier de chromatographie - Le papier Whatman 3 MM lavé préalablement à l'alcool à 95° fournit des résultats constants.

● Mode opératoire - La solution à doser est déposée sur le papier avec une ultra micro-burette à vis micrométrique (PROLABO) permettant d'avoir des taches de diamètre réduit avec une erreur de volume très faible.

● Lecture au densitomètre - La lecture se fait en lumière ultra-violette à 350 nm (Appareil VERNON). La longueur de la fente est fixe, le diamètre de la tache doit lui être inférieur. Le papier, après chromatographie, est divisé en bandes de 4 cm de large, au centre desquelles se trouvent les taches à doser.

Fidélité de la méthode de dosage comportant les trois temps - On traite 20 échantillons identiques d'un même lot de poudre grossière (tamis module 26) de feuilles sèches de Bryone. Trois extractions successives sont faites par l'alcool méthylique. Les solutions extractives sont concentrées à sec, puis on ajuste à un volume de 20 ml avec l'alcool méthylique à 70 pour 100. Chromatographie de ces extraits avec un dépôt de 10 µl par tache puis lecture par densitométrie (moyenne 52 µg ; écart type 2,7).

● Discussion et conclusion - Cette méthode est apparue séduisante au début, car elle permettait de doser séparément les différents flavonoïdes. Or, à l'usage, elle s'est révélée très longue, car les solutions extractives, même concentrées, ont une faible teneur en flavonoïdes, et chaque tache nécessite un dépôt important, donc long à sécher.

D'autre part, les concentrations des différents principes actifs étant très différentes, on ne peut doser que FvA (flavonoïde principal) et FvB dans les parties de la plante où il est plus abondant, tels les limbes. A' et B' ne peuvent pas être dosés, car si on concentre trop la solution, FvA précipite.

L'appareil utilisé n'est pas très sensible, car il ne peut doser des quantités inférieures à celles perçues par l'oeil en lumière U.V. (0,5 µg de A). La méthode a dû être abandonnée au profit de la spectrophotométrie.

B - Spectrophotométrie

Dans des conditions de pH définies (voisin de 6), les hétérosides de la Bryone fournissent une coloration jaune en présence d'un sel d'aluminium. La technique de ROMISCH (1960) modifiée par DELAVEAU (1967) est utilisée.

On mesure successivement l'extrait purifié, puis les divers réactifs. Un blanc est préparé sans chlorure d'aluminium (voir Tableau V). La mesure spectrophotométrique de la coloration jaune est effectuée entre 20 minutes et

3 heures, après mélange des réactifs (Spectrophotomètres UNICAM SP 500 et BECKMAN D.B.) à 388 nm.

Tableau V

Protocole du dosage spectrophotométrique
Selon ROMISCH (1960)

Dans des tubes à essais (16 cm x 16 cm) sont mesurés successivement en ml :

	Essai	Blanc
- Extrait purifié	2	2
puis les réactifs :		
- Solution aqueuse d'acide acétique à 1 pour 100	1	1
- Solution aqueuse de pyridine à 2 pour 100	2	2
- Solution alcoolique de chlorure d'aluminium 0,5 M	1	0
- Alcool éthylique à 95°	0	1

On utilise comme référence une gamme apportant, dans 6 ml du mélange des réactifs, respectivement 25, 50, 75, 100 µg de FvA (solution de 500 µg par ml d'alcool éthylique) distribuée à l'aide de l'ultra-micro-burette.

Le calcul tient compte des volumes V de l'extrait préparé à partir de la prise d'essai m et v partie aliquote de cet extrait.

$$F = f \cdot \frac{V}{v}$$

f : teneur en flavonoïdes mesurée
F : teneur rapportée à la prise d'essai

Pour 100 g de matière fraiche

$$F \cdot \frac{100}{m}$$

et par plante $\frac{F}{n}$ ou $F \cdot \frac{M}{m}$

selon que sont traités les organes de n plantes ou seulement une partie aliquote m de la masse totale M.

Discussion et conclusion - L'erreur de la méthode de dosage comportant les trois temps successifs est appréciée sur un lot homogène de limbes foliaires secs, broyés, divisé en 20 échantillons traités séparément.

Nous obtenons les valeurs suivantes :

Moyenne $\mu = 1621$ mg de A pour 100 g de matière sèche
Variance = 246 282 écart type = 114.
soit 100 ± 14 pour 100

Cette méthode nous permet de doser des solutions de faibles concentrations (à partir de 25/µg de A, début de la gamme). D'autre part, nous pouvons vérifier la présence effective des flavonoïdes en examinant le spectre complet de la solution ; enfin cette méthode est plus rapide que la densitométrie.

Nénamoins, on peut faire quelques réserves en ce qui concerne la précision du dosage : la fluorescence jaune observée est moins prononcée pour les hétérosides de flavones que pour les flavonols ; les résultats du dosage sont exprimés en FvA, ce flavonoïde étant le plus abondant ; les dosages ont été effectués à une longueur d'onde (388 nm) proche du maximum présenté par les flavonoïdes A et B. Nous effectuons donc un dosage global, les causes d'erreur ayant été limitées autant que possible.

CHAPITRE III

RÉPARTITION ET ÉVOLUTION DES FLAVONOIDES

I - INTRODUCTION

Si la répartition et la variation des flavonoïdes ont fait l'objet de plusieurs recherches (MASCRE et PARIS, 1950, NICK 1953, NOLL 1955, ESDORN et NOLL 1955, SPRECHER 1956, BASSLER 1957, URBAN 1959, DZEMUKHADZE BUZUN et NESTYUK 1962, UL YANOVA 1962, CLAIR, DELAVEAU et PARIS 1964, DELAVEAU 1967), par contre peu de travaux d'ordre physiologique (MALIK 1965, M. PARIS 1966) ont été effectués sur des plantes contenant des flavonoïdes du type C-glucosides.

C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris une étude concernant la répartition des flavonoïdes dans les divers organes de la Bryone, et essayé de suivre la variation de teneur dans ces organes au cours du cycle végétatif de la plante.

D'autre part, il s'agit d'une plante à vrilles et les travaux de Mme TRONCHET (1959, 1961) ont attiré l'attention sur une répartition inégale des flavonoïdes entre vrilles non stimulées et vrilles stimulées ainsi qu'entre les faces supérieures et inférieures des tiges rampantes.

En outre, la Bryone est une plante dioïque : existe-t'il une différence qualitative et quantitative entre les divers organes des pieds mâles et des pieds femelles ?

Pour cette étude, il est nécessaire de réaliser une culture de la plante. Il nous fallait donc établir les conditions de reproduction de la plante et, en particulier, étudier la germination des graines.

II - CONDITIONS DE CULTURE ET ETUDE DE LA GERMINATION DES GRAINES

- Conditions de culture

La Bryone est considérée par les jardiniers comme une mauvaise herbe, assez difficile à éliminer, du fait de la présence d'une racine puissante qui s'enfonce assez profondément dans le sol.

Dans les conditions naturelles, la propagation de la plante parait se faire presque uniquement par reproduction sexuée. Si l'on veut réaliser une culture, on peut utiliser la multiplication végétative par éclats de racine ou par boutures ou la reproduction sexuée. Celle-ci est faite par semis, en place ou en pépinière.

Les graines sont semées aussitôt qu'elles sont mûres, à la fin de l'automne. Un nombre restreint germe au printemps suivant. Ayant eu des déboires avec des germinations en pleine terre, nous avons cherché à obtenir une germination plus régulière dans une serre conditionnée.

- Serre conditionnée

Pour étudier la variation de la teneur en flavonoïdes à différents stades de la plante, nous avons été amenée à cultiver la Bryone en serre conditionnée, ou "Micro-phytotron" CRAPEZ modifié, permettant d'assurer des conditions variables.

1/ Lumière de 100 à 16 000 lux, produite par des tubes fluorescents Mazdafluor "Blanc super". L'appoint en radiations rouges est fourni par une dizaine de petites lampes à incandescence sous-voltées.

2/ Température de + 5°C à + 32°C.

3/ Humidité de 40 à 100 pour 100.

Les conditions suivantes, correspondant aux données optimales dans les "Super-serres" et au climat du mois de Juin, ont été généralement retenues : Jour 16 h - Température θ 24° ± 1°C - Humidité relative H.R 60 à 80 pour 100 - Nuit 8 h - Température 14° ± 1°C.

- Etude de la germination des graines

Nous avons rencontré beaucoup de difficultés, dues à une germination très irrégulière des graines.

Les baies récoltées sont mises à sécher à la température ordinaire et conservées à cette température jusqu'à leur semis. Les graines utilisées, exemptes de pulpe, ont été récoltées en 1964, 1965, 1966. Elles sont mises à germer dans les conditions suivantes :

- Eclairement - 16 000 lux, 600 lux et 1700 lux. La température est de 24 à 28°C le jour et 14° à 15°C la nuit.

- Humidité - 60 à 80 pour 100

130 graines sont placées dans des terrines de 40 x 30 cm contenant du terreau et de la terre franche (1-1).

Les premières graines germent au bout de 6 jours. La récolte est faite trois semaines après. Nous obtenons entre 15 et 25 plantules à chaque niveau. Donc *15 pour 100* seulement des graines ont germé (quelle que soit la

date de récolte des graines) au bout de cette période. Le pourcentage obtenu est faible et d'autre part la taille et l'aspect des plantules sont variables du fait que les graines ont germé très irrégulièrement.

Nous avons supposé une dormance et avons essayé de la lever par des moyens classiques (ROLLIN, 1963).

- Traitement à l'éther éthylique :

  Lavage des graines à l'éther éthylique pendant 3 heures

- Scarification chimique :

  Trempage des graines dans l'acide sulfurique concentré pendant une heure

- Stratification

  Séjour à la glacière pendant 10 jours à - 4°C, en boite de Pétri, entre deux épaisseurs de papier filtre humide.

Le séjour des graines en réfrigérateur a donné des résultats en ce qui concerne la régularisation de la germination, mais le pourcentage des plantules obtenues n'a pas augmenté.

Si nous remettons la terrine au microphytotron, après une première récolte, nous obtenons une deuxième récolte aussi abondante après une durée égale. Donc les graines n'ont pas perdu leur pouvoir germinatif, mais il nous a été impossible d'obtenir une germination groupée.

III - REPARTITION DES FLAVONOIDES DANS LES DIVERS ORGANES

A - Introduction

Contrairement aux apparences, la récolte des pieds de Bryone est assez délicate ; cette plante s'accrochant par ses vrilles aux arbres, haies et clôtures, on risque de la blesser et ne pas pouvoir obtenir le pied dans son intégrité.

D'autre part, la pénurie de terrain de culture à la Faculté de Pharmacie nous à obligé à récolter des plantes dans les parcs et jardins où elles sont traitées comme "mauvaises herbes". Certaines expériences risquent donc d'être incomplètes.

B - Recherches préliminaires (Plantes récoltées au Parc de Bagatelle)

Avec ce lot, les premières expériences ont été effectuées au mois de Septembre, la plante adulte ayant atteint, à cette époque, son plein développement. Les essais ont porté sur trois pieds.

Chaque plante est divisée en trois parties : inférieure, moyenne et supérieure. Dans chacune d'elles nous séparons limbes, pétioles, tiges,

flagelles (*), vrilles, fleurs et éventuellement fruits. La présence des flavonoïdes est vérifiée, par chromatographie sur papier, dans les extraits alcooliques des divers organes séparés, selon le procédé décrit page 23.

Si les flavonoïdes sont absents des racines, tous les organes aériens en contiennent à des concentrations différentes (voir Tableau VI). Les dosages ont été faits par spectrophotométrie (suivant le procédé décrit page 43).

On remarque :

- Les limbes contiennent 81 pour 100 des flavonoïdes totaux des parties aériennes ;

- La teneur des limbes du tiers supérieur de la tige exprimée en mg de FvA par 100 g de limbes frais ou secs, est nettement plus élevée que celle des limbes des tiers moyens et inférieurs de la tige dont les teneurs sont voisines.

Tableau VI

Répartition des flavonoïdes dans la plante récoltée au mois de septembre au parc de bagatelle (moyenne de 3 expériences)

Nature de l'organe	Matière sèche p. 100	Masse par plante	Teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 g de matière fraiche ou sèche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes supérieurs	26	3,24g	694	2678	22,50	28
Limbes moyens	27	4,50	451	1925	23,40	29
Limbes inférieurs	28	3,75	425	1828	19,00	24
Pétioles supérieurs	13	0,31	190	1512	0,6	0,7
Pétioles moyens	10	0,8	93	937	0,75	0,9
Pétioles inférieurs	12	0,85	95	804	0,82	1
Tiges (**)	11	2,71	78	710	2,10	2
Flagelles	10	1,14	216	2105	2,40	3
Vrilles	12	3,70	184	1531	6,80	8
	Total :	21,00		Total :	78,37	

TMF - Teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 g de plante fraiche
TMS - Teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 g de plante sèche
TP - Teneur en flavonoïdes exprimée en mg par plante (parties aériennes)

(*) Vrilles non stimulées (non enroulées).

(**) Il s'agit de la totalité de la tige la teneur en flavonoïdes étant très faible dans cet organe.

Nous pouvons faire une remarque identique pour les pétioles des tiers supérieurs, moyens et inférieurs comparés entre-eux, leur teneur absolue étant d'ailleurs assez faible.

Les "flagelles" (vrilles non stimulées) sont plus riches que les vrilles enroulées, leur teneur étant voisine de celle des limbes moyens. Les tiges semblent les organes les plus pauvres en flavonoïdes. On constate donc une décroissance depuis les jeunes feuilles jusqu'à la racine.

Les pieds récoltés étaient des pieds mâles, mais chaque pied ne portait pas suffisamment de fleurs pour permettre un dosage ; nous avons donc récolté toutes les fleurs des échantillons et réalisé un dosage en rapportant au poids frais et au poids sec, mais non à la plante. On trouve 1380 mg de FvA pour 100 g de matière sèche.

Les résultats concernant les autres plantes sont présentés sous forme de graphiques où sont différenciées les teneurs en flavonoïdes correspondant aux limbes inférieurs, moyens et supérieurs d'une part aux "flagelles" et aux vrilles enroulées, fleurs et fruits d'autre part.

C - Etude de différents lots

- Lot n° 1 - Plantes récoltées dans le Parc de Sceaux (Tableau VII à XI et fig. 2)

Les pieds récoltés en Juin au moment de la floraison sont très bien exposés. Ils sont accrochés à des Ifs qui se trouvent en plein soleil.

- Nous constatons que la teneur en flavonoïdes des limbes du tiers supérieur est nettement plus importante que celle des limbes des tiers moyens et inférieurs ;
- Les flagelles semblent plus riches en flavonoïdes que les vrilles mais les différences ne sont pas toujours très accusées ;
- La teneur des fleurs est très variable d'un pied à l'autre.

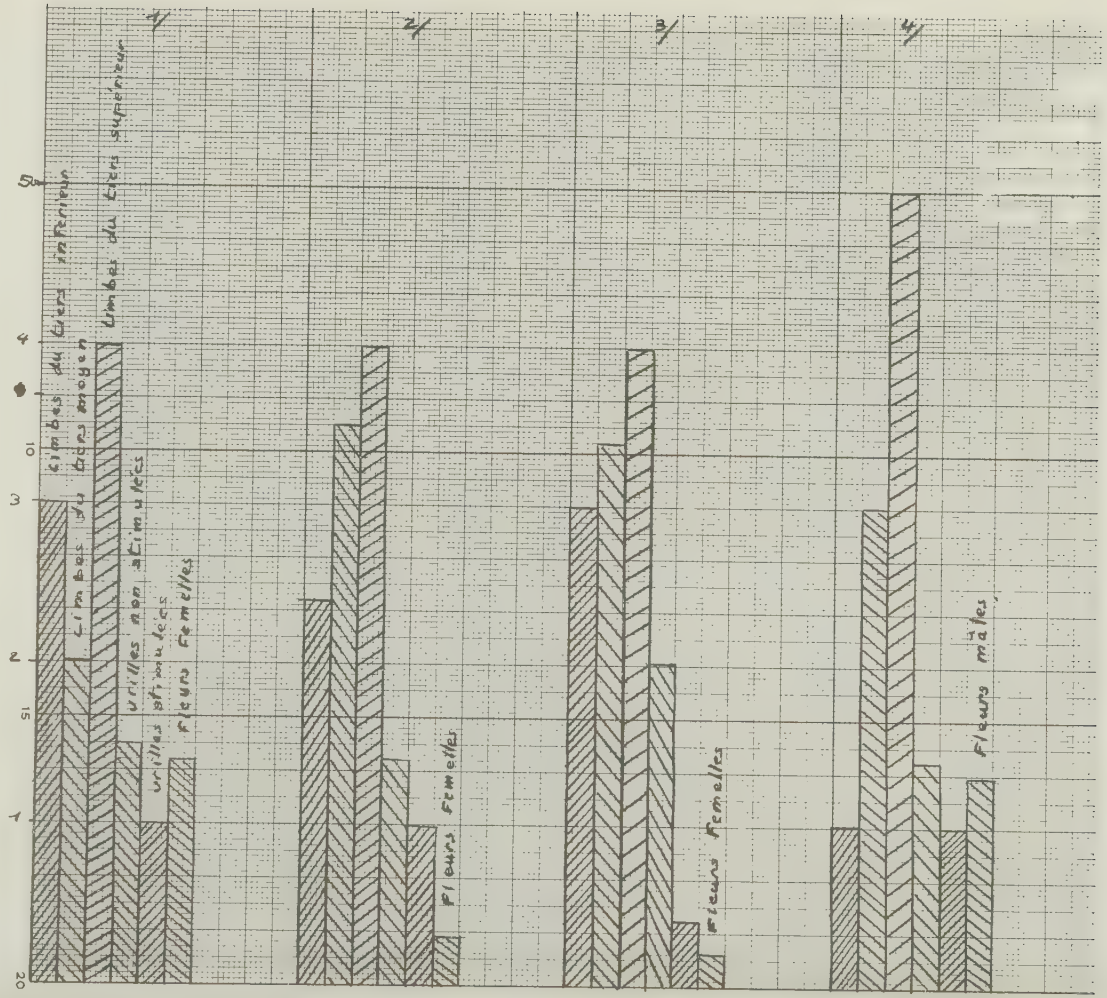


Figure 2 - Plantes récoltées en juin au parc de Sceaux. Teneur en flavonoïdes (en g pour 100 g de matière sèche).

Tableau VII

Lot n° 1 : plante n° 1 (♀) récoltée au parc de Sceaux

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière sèche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière séche ou fraîche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	5,51	16	635	3014	35	16
Pétioles inférieurs	3,13	5,72	26,2	431,6	0,82	0,4
Tiges inférieures	13,15	8	12,26	141	1,6	0,7
Limbes moyens	19,90	18,13	498,5	2250	99	45
Pétioles moyens	7,50	6,55	44	627,4	9,3	1,5
Tiges moyennes	44,70	8,31	22,9	250,6	10,2	4,6
Limbes supérieurs	5,40	17,11	863	4146	46,6	21
Pétioles supérieurs	2,23	8	36,75	422,7	0,82	0,4
Tiges supérieures	10,00	9,88	45	386,6	4,5	2
Vrilles	4,00	10,7	138,75	1158	5,5	2,5
Flagelles	0,78	10,17	175	1545	1,36	0,6
Sommités	2,16	15,74	523,9	2810	11,3	5
Fleurs femelles	0,23	8	119,5	1375	0,27	0,1

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 82 pour 100 des flavonoïdes totaux.

Tableau VIII

Lot n° 1 : plante n° 2 (♀) récoltée au parc de Sceaux

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière sèche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraîche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	16,95	16,11	460	2396	78	28
Pétioles inférieurs	2,69	7,08	39,4	517	1	0,3
Tiges inférieures	27,06	13,25	13	84,6	3,5	1
Limbes moyens	15,87	15,4	630	3460	100	37
Pétioles moyens	7,87	3,53	25,16	687	1,98	0,7
Tiges moyennes	32,3	10,5	35,6	303,6	11,5	4
Limbes supérieurs	12,55	19,33	370,5	4278	46,5	17
Pétioles supérieurs	2,85	7,53	56	689,6	1,6	0,5
Tiges supérieurs	25,24	9,24	32,5	319	8,2	2,6
Vrilles	5,25	13,5	163,8	1050	8,6	3
Flagelles	1,6	12,12	224	1619	3,58	1,3
Sommités	3,22	15,6	345	1862	11,1	4
Fleurs femelles	4,39	8	30,5	351	1,34	0,4

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 82 pour 100 des flavonoïdes totaux

Tableau IX

Lot n° 1 plante n° 3 (♂) récoltée au parc de Sceaux

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière sèche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraîche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	8,273	18,62	272	1188,6	37,5	19
Pétioles inférieurs	3,218	6,07	31	480,7	1	0,5
Tiges inférieures	13,263	8,97	29,7	210	2,75	1,4
Limbes moyens	11,172	17,06	559	2719,7	62,5	32
Pétioles moyens	2,893	8,04	38,7	442,7	1,12	0,58
Tiges moyennes	7,604	9,14	36	359	2,75	1,4
Limbes supérieurs	6,031	17,12	1160	5586	70	36
Pétioles supérieurs	1,89	6,94	39,7	532	0,75	0,39
Tiges supérieures	8,939	8,58	30,7	327,7	2,75	1,4
Vrilles	2,667	10,8	140,6	1161	3,75	1,9
Flagelles	0,52	10,31	157,7	1366	0,82	0,42
Sommités	0,885	16,34	406,8	2081	3,6	1,8
Fleurs mâles	1,771	8	118,6	1363	2,1	1

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 87 pour 100 des flavonoïdes totaux

Tableau X

Lot n° 1 plante n° 4 (♀) récoltée au parc de Sceaux

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière sèche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraîche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	6,28	14,25	461,8	2778	29	26,6
Pétioles inférieurs	1,115	6,30	38,5	573,3	0,43	0,39
Tiges inférieures	7,7	10,7	22,85	189	1,76	1,6
Limbes moyens	5,377	15,6		3772,6	37,5	34,4
Pétioles moyens	1,22	6,9	162,3	2200	2	1,8
Tiges moyennes	4	10,4	17,5	140	0,7	0,64
Limbes supérieurs	3	19	966,6	3536	29	26,6
Pétioles supérieurs	0,225	9,63	484,4	4125	1	0,9
Tiges supérieures	4,58	9	51	508,7	2,34	2,1
Vrilles	1,065	12,56	164,3	1143	1,75	1,6
Flagelles	2,2	1,2	266	2089	0,585	0,5
Sommités	0,589	17,38	467	2218	2,7	2,5
Fleurs femelles	0,195	7,94	110	253	0,215	0,2

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 87,6 pour 100 des flavonoïdes totaux.

Tableau XI

Lot n° 1 plante n° 5, récoltée au parc de Sceaux

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière sèche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraîche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	4,08	14,08	478	2910	19,5	10
Pétioles inférieurs	3,2	7,48	35	431,6	1,12	0,58
Tiges inférieures	16,15	11,7	21,17	159,8	3,4	1,76
Limbes moyens	12,9	16,51	686	3443	88,5	45
Pétioles moyens	3,1	8,75	69,67	720	2,16	1,1
Tiges moyennes	6,208	11,73	74	557,6	4,6	2,3
Limbes supérieurs	15,77	15,77	424,85	3768	67	34
Pétioles supérieurs	2,4	9,65	71,6	668	1,7	0,87
Tiges supérieures	5,56	12,84	57,5	390	3,2	1,6
Vrilles	2,3	14,02	72,17	442,6	1,66	0,8
Flagelles	0,171	13,58	386	2444	0,66	0,3

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 89 pour 100 des flavonoïdes totaux.

- Lot n° 2 - Plantes récoltées à Bourg-la-Reine

- Les limbes du tiers supérieur sont les plus riches, mais les différences avec les limbes des parties moyenne et inférieure sont moins grandes.
- Les flagelles sont nettement plus riches que les vrilles enroulées.
- La teneur des fleurs (femelles) voisine de celle des vrilles, est faible par rapport à celle des feuilles (voir Tableaux XII à XIV et fig. 3).
- Le teneur en flavonoïdes des limbes ne dépasse pas 76,6 pour 100 des flavonoïdes de la plante, ils sont donc moins riches que dans les plantes du Lot n° 1.

- Lot n° 3 - Plantes récoltées au jardin de la Faculté

Le terrain n'est pas très riche est les plantes ne sont pas très bien éclairées ; on note une teneur des limbes en flavonoïdes comprise entre 65 et 70 pour 100 du total.

Les limbes du tiers supérieur sont plus riches que les limbes des tiers moyen et inférieur.

Les flagelles sont plus riches que les vrilles enroulées. Au contraire des fleurs ♀ du Lot n° 2, les fleurs mâles présentent une teneur en flavonoïdes assez élevée, voisine de celle des flagelles (voir fig. 4 et tableaux XV à XVII).

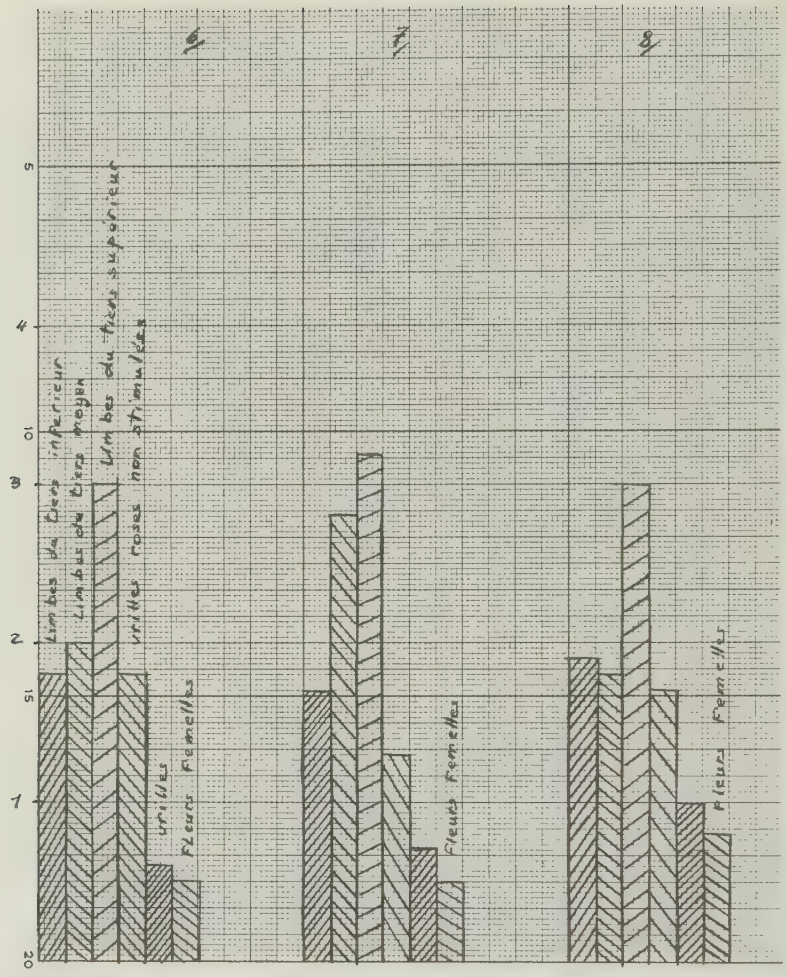


Figure 3 - Plantes récoltées à Bourg-la-Reine. Teneur en flavonoïdes (en g pour 100 g de matière sèche).

- Lot n° 4 - Plantes en fruits récoltées à St. Privé, (Yonne) le long de haies bordant les champs.

- Eclairement satisfaisant.

- La teneur des limbes du tiers supérieur est différente d'un pied à l'autre, bien qu'elle reste toujours supérieure à celle des limbes des tiers moyen et inférieur.

- Dans ce lot, les teneurs des "flagelles" et des vrilles enroulées sont voisines. Le pied mâle étudié possède des fleurs dont la teneur en flavonoïdes est assez élevée (2 g pour 100 de matière sèche).

- Les fruits sont pauvres en flavonoïdes, les baies rouges mûres étant moins riches que les baies vertes (fig. 5 et tableaux XVIII à XX).

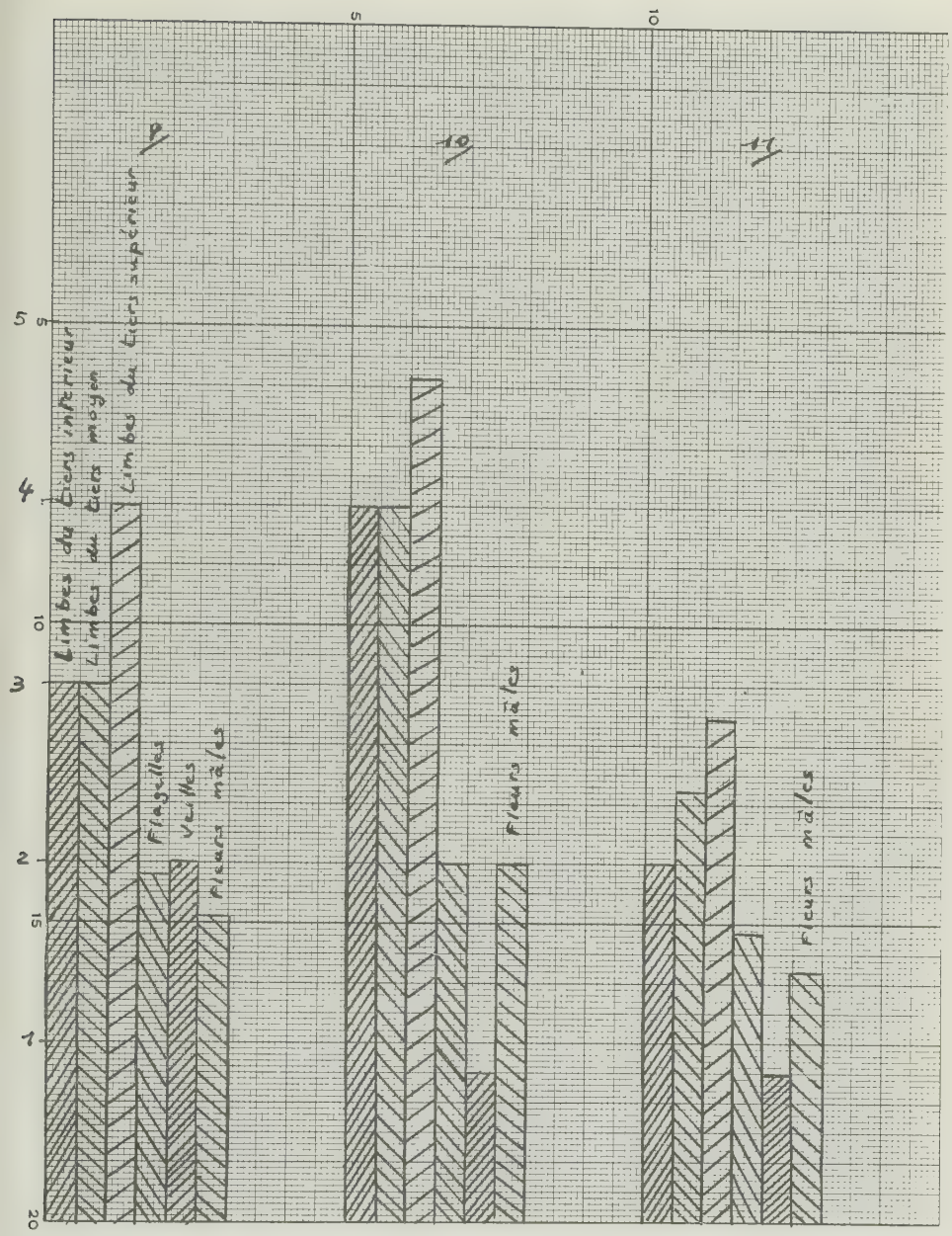


Figure 4 - Plantes récoltées au jardin de la Faculté de Pharmacie de Paris (pieds mâles). Teneur en flavonoïdes (en g pour 100 g de matière sèche).

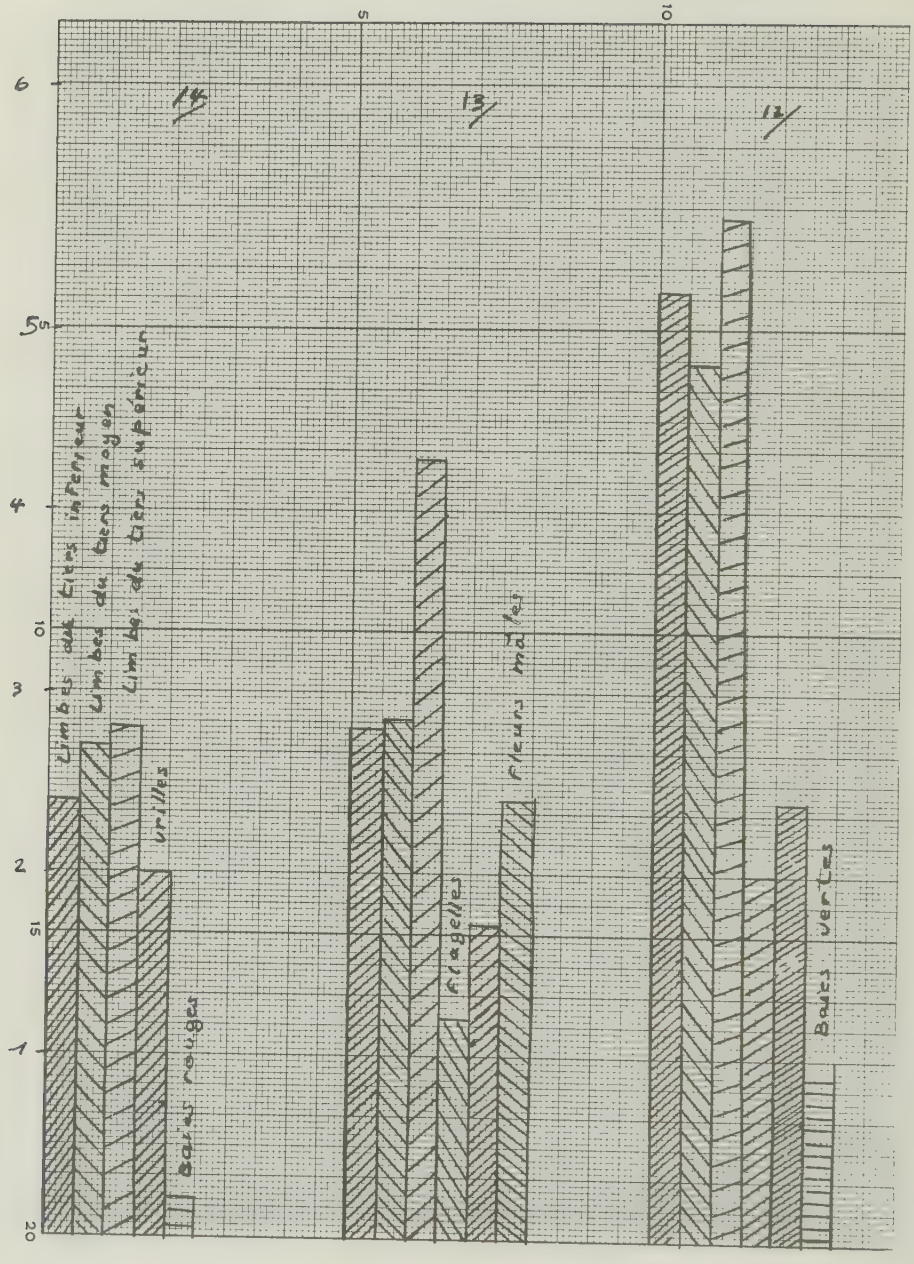


Figure 5 - Plantes récoltées à St Privé dans l'Yonne à l'époque des fruits. Teneur en flavonoides (en g pour 100 g de matière sèche).

Tableau XII

Lot n° 2 : plante n° 6 (♀) récoltée à Bourg-la-Reine

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière sèche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraîche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	13,968	15	322	1825	45	20
Pétioles inférieurs	2,52	7	25	331,57	0,63	0,26
Tiges inférieures	36,7	10	13,6	122,55	5	2,03
Limbes moyens	16,89	15	361	2045	61	27,6
Pétioles moyens	7,125	5	10,94	208	0,78	0,35
Tiges moyennes	16,22	10	23,5	211,86	3,82	1,7
Limbes supérieurs	11,55	16	554	2909	64	29
Pétioles supérieurs	4,1	8	57	570	2,34	1,0
Tiges supérieures	32,6	12	35,88	263	11,7	5,3
Vrilles	9,54	10	70,23	632	6,7	3
Flagelles	9,41	10	195	1755	8,6	3,8
Sommités	4,453	14	224,5	3448	10	4,5
Fleurs femelles	2,36	12	72,88	532,3	1,72	0,7

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 76,6 pour 100 des flavonoïdes totaux.

Tableau XIII

Lot n° 2 : plante n° 7 (♀) récoltée à Bourg-la-Reine

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière sèche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraîche			
						Pourcent. du total
Limbes inférieurs	14,049	19	327,4	1719	46	21
Pétioles inférieurs	2,992	6	23,39	330,53	0,7	0,4
Tiges inférieures	16,416	12	18,88	152,78	3,1	1,8
Limbes moyens	6,14	27	528,4	2774	32,5	19
Pétioles moyens	2,01	6	23,88	342,8	0,48	0,28
Tiges moyennes	12,173	9	32,36	327,2	3,8	2,2
Limbes supérieurs	8,85	21	706	3216,67	62,5	36
Pétioles supérieurs	2,18	8	39,4	452,6	0,86	0,5
Tiges supérieures	18,225	10	45	441	8,2	4,8
Vrilles	4,03	13	96,65	743,8	3,9	2,2
Flagelles	1,47	14	197,3	1318	2,9	1,6
Sommités	1,55	17	355	2012	5,5	3,2
Fleurs femelles	1,5	11	65,3	584	0,98	0,57

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 76 pour 100 des flavonoïdes totaux.

Tableau XIV

Lot n° 2 : plante n° 8 (♀) récoltée à Bourg-la-Reine

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière séche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraiche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	9,3	14	317	1930	29	21
Pétioles inférieurs	2,71	6	24	381	0,66	0,4
Tiges inférieures	36	11	15	119	5,3	3
Limbes moyens	10	15	325	1833	32,5	23
Pétioles moyens	2,6	7	32	474	0,84	0,6
Tiges moyennes	14	11	31	254	4,4	3,2
Limbes supérieurs	6,9	17	623	3024	43	31
Pétioles supérieurs	1,7	7	52	680	0,88	0.6
Tiges supérieures	9,8	9	62	364	6,1	4,4
Vrilles	3,6	11	124	1006	4,5	3,2
Flagelles	1,6	10	191	1722	3,1	2,2
Sommités	1,4	15	398	2254	5,5	4
Fleurs femelles	1,7	11	99	803	1,7	1,2

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 75 pour 100 des flavonoïdes totaux.

Tableau XV

Lot n° 3 : plante n° 9 (♂) récoltée au Jardin de la Faculté

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière séche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraîche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	7,5	14	413	2924	31	15,8
Pétioles inférieurs	1,08	6	34	569	0,37	0,18
Tiges inférieurs	11	11	38	341	4,2	2
Limbes moyens	14	15	446	2973	62,5	31,8
Pétioles moyens	6,2	7	59	837	3,6	1,8
Tiges moyennes	1,8	11	56	514	10,2	5,2
Limbes supérieurs	5,1	17	717	4145	36,6	18,6
Pétioles supérieurs	0,8	7	72	983	0,58	0,29
Tiges supérieurs	14	99	66	722	9,3	4,7
Vrilles	6,2	11	245	2200	15,2	7,7
Flagelles	1,36	10	206	2059	2,8	1,4
Sommités	2,3	7	439	2944	10,1	5
Fleurs mâles	3,8	15	258	1701	9,8	5

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 67 pour 100 des flavonoïdes totaux.

Tableau XVI

Lot n° 3 plante n° 10 (♂) récoltée au Jardin de la Faculté

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière sèche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraîche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	19	14	525	3912	105	26
Pétioles inférieurs	3	6	45	727	1,4	0,35
Tiges inférieures	48	11	3	25	13	3,3
Limbes moyens	13,6	15	588	3902	80	20
Pétioles moyens	2,2	7	47	675	1	2,5
Tiges moyennes	21,5	11	52, 7	477	11,3	2,8
Limbes supérieurs	9,5	17	800	4709	76	19,4
Pétioles supérieurs	1,6	7	74	1026	1,2	0,3
Tiges supérieures	18	9	41 6	467	7,5	1,9
Vrilles	15,4	11	93,5	849	14,4	3,6
Flagelles	2	10	192	2121	4	1
Sommités	3	7	646	4292	19,4	4,9
Fleurs mâles	23,5	15	146,5	2093	34	8,7

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 65,4 pour 100 des flavonoïdes totaux

Tableau XVI

Lot n° 3 plante n° 10 (♂) récoltée au Jardin de la Faculté

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière sèche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraîche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	8,14	15	301	2000	24,5	17,3
Pétioles inférieurs	2,17	6	18,4	302	0,4	0,28
Tiges inférieures	11,63	9	38,5	229	2,4	1,7
Limbes moyens	8,56	16	385	2408	33	23,4
Pétioles moyens	1,76	3	23	778	0,41	0,29
Tiges moyennes	10,15	9	31,5	350	3,2	2,2
Limbes supérieurs	11,70	11	350	3183	41	29
Pétioles supérieurs	1,80	8	36,5	458,3	0,66	0,46
Tiges supérieures	11,02	9	27,7	419	6,8	4,8
Vrilles	6,62	12	130	1075	8,6	6
Flagelles	1,84	12	214	1793	3,3	2,3
Sommités	1,26	19	832	4375	10,5	7,3
Fleurs mâles	2,69	14	222	1590	6	4

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 69,7 pour 100 des flavonoïdes totaux.

Tableau XVIII

Lot n° 4 : plante n° 12 (♀) récoltée dans l'Yonne

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière sèche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraîche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	11	19	1030	5459	113	30
Pétioles inférieurs	2,4	11	84	769	2	0,5
Tiges inférieures	3,4	53	71	133	2,4	0,6
Limbes moyens	12,4	21	1029	4884	127	33,7
Pétioles moyens	2	12	137	1160	2,9	7,7
Tiges moyennes	5	52	136	2619	6,6	1,7
Limbes supérieurs	6	22	1265	5692	74	19,6
Pétioles supérieurs	1	18	184	1000	2	0,53
Tiges supérieures	2,4	18	316	1750	7,7	2
Vrilles	3,4	19	468	2461	16	4
Flagelles	0,8	33	699	2143	6	1,5
Sommités	0,9	26	1034	3960	9,9	2,6
Baies vertes	25,4	29	23	88	6,6	1,7

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 83 pour 100 des flavonoïdes totaux

Tableau XIX

Lot n° 4 : plante n° 13 (♂) récoltée dans l'Yonne

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière sèche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraîche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	13	19	531	2800	70	29
Pétioles inférieurs	1,5	11	90	819	1,4	0,6
Tiges inférieures	10	53	39	74	4	1,6
Limbes moyens	9	21	593	2822	52,5	21,8
Pétioles moyens	1,4	12	61	517	0,9	0,37
Tiges moyennes	9	52	45	86	4	1,6
Limbes supérieurs	6,6	22	948	4310	62,5	26
Pétioles supérieurs	0,7	18	89	496	0,7	0,2
Tiges supérieures	8	18	122	678	9,5	3,9
Vrilles	4,4	19	330	1735	14,4	6
Flagelles	0,3	33	405	1235	1,3	0,5
Sommités	1,6	26	734	2829	11,6	4,8
Fleurs mâles	2,5	17	411	2428	10	4

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 77 pour 100 des flavonoïdes totaux.

Tableau XX

Lot n° 4 : plante n° 14 (♀) récoltée dans l'Yonne

Nature de l'organe	Masse par plante en g	Matière sèche p. 100	Teneur en mg de flavonoïdes pour 100 grammes de matière sèche ou fraîche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes inférieurs	8,57	19	455	2392	39	25
Pétioles inférieurs	1,24	15	53	355	0,66	0,4
Tiges inférieures	6,33	53	38	72	2,4	1,5
Limbes moyens	8,83	21	566	2695	50	32
Pétioles moyens	0,76	12	117	1000	0,9	0,6
Tiges moyennes	3,38	52	139	267	4,7	3
Limbes supérieurs	5,30	22	830	3793	44	28
Pétioles supérieurs	0,34	18	308	1750	1	0,6
Tiges supérieures	1,76	18	249	1375	4,4	2,8
Vrilles	2,48	19	398	2106	9,9	6,4
Baies rouges	11,27	31	66,5	214	7,5	5

Teneur en flavonoïdes des limbes par plante : 85 pour 100 des flavonoïdes totaux.

Les résultats assez hétérogènes qui sont obtenus peuvent s'expliquer par des conditions écologiques variables :

Au Jardin de la Faculté de Pharmacie, l'exposition des plantes est mauvaise, il y a assez peu de différences d'éclairement entre les parties supérieures et inférieures de la plante.

Au contraire, au Parc de Sceaux, les plantes se trouvent en plein soleil, accrochées à des Ifs, les parties supérieures sont bien dégagées et on peut voir là une relation entre l'éclairement et la teneur en flavonoïdes, conformément aux résultats obtenus par divers auteurs, en particulier par NOLL (1955) chez le Sarrasin.

D'autre part, on peut noter des variations de teneur en flavonoïdes assez considérables d'une plante à l'autre ; ceci peut s'expliquer par l'exposition variable et peut-être aussi par la nature du terrain.

Les flagelles semblent ici plus riches que les vrilles stimulées. Mme TRONCHET (1959-1961) avec d'autres plantes à vrilles ou à tiges volubiles (*Convolvulus sepium*, *Passiflora coerulea*, etc...) a constaté la richesse en flavonols des flagelles et la diminution de certains d'entre-eux au cours de la circumnutation.

Il est à remarquer que dans le cas de la Bryone, il ne s'agit pas de flavonols mais de C hétérosides de flavones, et la richesse en flavonoïdes paraît conditionnée par l'âge et l'éclairement.

D - Conclusion

En ce qui concerne la répartition des flavonoïdes dans les différents organes, la majorité est contenue dans les limbes (70 à 80 pour 100). Ceci doit être rapproché des travaux de DELAVEAU (1967) sur la Capucine dont les limbes renferment 80 à 90 pour 100 des flavonoïdes de la plante.

Il semble que, dans le cas des C-hétérosides de flavones comme dans le cas des flavonols, ces substances soient spécialement localisées au niveau des organes les plus éclairés et assimilateurs que sont les limbes. Les *graines* séparées des fruits séchés ne contiennent pas de flavonoïdes (non plus que les racines).

Contrairement à ce que nous avions espéré, il n'a pas été trouvé de différences qualitatives ou quantitatives entre les pieds mâles et les pieds femelles, au moins en ce qui concerne les limbes, pétioles, tiges, flagelles et vrilles. Toutefois, il semble qu'au même stade les fleurs mâles soient plus riches que les fleurs femelles, ce qui peut-être lié à la présence des étamines.

Ainsi, comme chez beaucoup de végétaux, les organes les plus riches en flavonoïdes sont les jeunes feuilles du tiers supérieur de la tige ; on constate une diminution progressive vers la racine qui ne contient pas de flavonoïdes.

A côté de cet aspect quantitatif des flavonoïdes totaux, il était intéressant de rechercher les différences éventuelles de proportion relative des divers flavonoïdes.

Cette étude a été réalisée par chromatographie sur papier (solvant S_3) et appréciation visuelle de l'intensité des taches. La quantité minimale de FvA perçue par l'oeil est de 0,5 µg.

Les proportions relatives des quatre substances sont identiques dans les limbes des plantes en fleurs et en fruits FvA' et FvB' paraissent absents des vrilles, des flagelles et des fruits. Les fleurs mâles contiennent le flavonoïde B alors que celui-ci semble absent des fleurs femelles.

Le flavonoïde A est prépondérant à tous les stades de la vie végétative de la plante et il est seul présent dans les pétioles des plantes en fleurs et en fruits (Tableau XXI).

IV - VARIATION DES FLAVONOIDES EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE

- Influence de la lumière

Pour étudier l'influence éventuelle de la lumière sur la teneur en flavonoïdes de la Bryone, une série d'expériences ont été effectuées, les unes dans des conditions de culture normale, en pleine terre, à bonne exposition, de Juin à Septembre, les autres en microphytotron.

Tableau XXI

Evaluation des différents flavonoïdes de la Bryone séparés par chromatographie sur papier

	FvA	FvB	FvA'	FvB'
Limbes de plantes en fleurs	+++++	+++	++	+++
Petioles de plantes en fleurs	+++	0	0	0
Tiges	++	+	traces	traces
Vrilles	+++	++	traces	traces
Flagelles	+++	++	traces	traces
Fleurs femelles	+++	0	+++	0
Fleurs mâles	+++	++	++	0
Pétioles de plantes en fruits	+++	0	0	0
Tiges	+++	+++	0	0
Vrilles	+++	+++	0	0
Flagelles	+++	+++	0	0
Baies vertes	++	traces	0	0
Baies rouges	++	0	0	0
Graines	0	0	0	0

Les plantes croissant dans des conditions normales ont été suivies jusqu'au 78ème jour (*).

Au contraire, en "microphytotron", l'éclairement relativement faible n'a pas permis aux plantes d'atteindre tous les stades du développement ; les expériences ont donc toujours porté sur des plantules ou des plantes de 4 semaines ou plus.

Le dosage des flavonoïdes par spectrophotométrie n'a été effectué que sur les limbes foliaires, chez les plantules très jeunes cultivées en microphytotron, étant donné la petitesse du matériel.

Pour les cultures en pleine terre, nous avons réalisé deux dosages : l'un sur les limbes foliaires (échantillons L_1, L_2, L_3, L_4, L_5) et l'autre sur le reste de la plante (échantillons R_1, R_2, R_3, R_4, R_5) : tige, pétioles et éventuellement vrilles.

Dans la plupart des expériences, pour un même essai, les limbes de plusieurs plantes ont dû être réunis en raison de leur faible masse.

A - Culture en conditions normales

Les graines sont semées en pleine terre le 8 Juin. La germination commence le 18 Juin.

(*) Les expériences auraient dû être arrêtées au 60ème jour ; ce sont des difficultés matérielles qui les ont fait se prolonger jusqu'au 78ème jour.

Quatre récoltes sont pratiquées :

- 1ère Récolte - Plantules âgées de 5 jours - Les plantules sont hautes de 5 cm et possèdent deux feuilles basales arrondies et deux autres très petites feuilles.

- 2ème Récolte - Plantules âgées de 15 jours - Elles ont 6 à 7 cm de haut et possèdent 6 à 7 feuilles dont deux arrondies à la base.

- 3ème Récolte - Plantules âgées de 30 jours - Elles ont 8 cm de haut et 12 à 16 feuilles.

- 4ème Récolte - Plantules âgées de 78 jours - Elles ont 60 à 70 cm de haut, 18 à 21 feuilles. On note la présence de vrilles.

La culture a été poursuivie pour obtenir des fleurs et des fruits, mais au bout d'un certain temps les plantules ont commencé à s'étioler sans atteindre les stades recherchés.

La teneur moyenne en flavonoïdes, exprimée en grammes (pour 100 g de limbes secs) est respectivement :

- pour les plantules de 5 jours - 3 g pour 100 (tableau XXII)
- pour les plantules de 15 jours - 1,6 g pour 100 (tableau XXIII)
- pour les plantules de 30 jours - 2,6 g pour 100 (tableau XXIV)
- pour les plantes de 78 jours - 13,6 g pour 100 (tableau XXV)

Le poids moyen des limbes frais d'une plantule exprimé en grammes est respectivement :

- pour les plantules de 5 jours : 0,08 g
- pour les plantules de 15 jours : 0,20 g
- pour les plantules de 30 jours : 1,04 g
- pour les plantes de 78 jours : 3,05 g

On remarque que la teneur en flavonoïdes des plantules de 5 jours est très élevée et que l'augmentation de poids observée, entre 5 jours et 30 jours, n'est pas suivie par une augmentation aussi importante de la teneur en flavonoïdes. Quant aux plantes adultes de 78 jours, leur teneur élevée en flavonoïdes correspond sans doute au maximum généralement observé avant la floraison (*).

(*) La teneur des plantes sauvages récoltées en fleurs et en fruits (voir pages 48 à 61) est légèrement inférieure.

Tableau XXII

Teneur en flavonoïdes de plantules de 5 jours

Nature de l'organe	Matière sèche p. 100 (*)	Masse par plante en g	Teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 grammes de matière fraîche ou sèche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes 1	9,4	0,079	265	2880	0,206	86 p 100
Tiges + Pétioles	10,4	0,049	65	625	0,032	
Limbes 2		0,087	283	2928	0,243	98
Tiges + Pétioles		0,050	59	567	0,030	
Limbes 3		0,083	298	3163	0,248	
Tiges + Pétioles		0,060	81	773	0,050	
Limbes 4		0,084	278	2982	0,234	86
Tiges + Pétioles		0,042	74	720	0,206	
Limbes 5		0,077	266	2880	0,206	97
Tiges + Pétioles		0,044	177	1125	0,050	

Légendes
TMF - teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 g de matière fraîche
TMS - teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 g de matière fraîche
TP - teneur en flavonoïdes exprimée en mg par plante
Teneur moyenne en flavonoïdes des limbes par plantule : 0,225 g

---

(*) Déterminée sur un échantillon moyen des 5 lots.

Tableau XXIII

Teneur en flavonoïdes des plantules de 15 jours

Nature de l'organe	Matière sèche p. 100	Masse par plante en g	Teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 grammes de matière fraîche ou sèche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes 1	15	0,279	268	1786	0,750	
Tiges + Pétioles	10	0,150	91	908	0,136	= 0,886 84 p 100
Limbes 2		0,170	243	1619	0,425	
Tiges + Pétioles		0,154	63	629	0,085	= 0,510 83
Limbes 3		0,234	213	1428	0,500	
Tiges + Pétioles		0,121	65	630	0,079	= 0,579 86
Limbes 4		0,233	257	1714	0,600	
Tiges + Pétioles		0,129	69	692	0,09	= 0,690 86
Limbes 5		0,165	197	1300	0,325	
Tiges + Pétioles		0,103	59	597	0,060	= 0,385 84

Légendes :
TMF - teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 g de matière fraîche
TMS - teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 g de matière fraîche
TP - teneur en flavonoïdes exprimée en mg par plante
Teneur moyenne en flavonoïdes des limbes par plantules : 0,5 mg

Tableau XXIV

Teneur en flavonoïdes de plantules de 30 jours

Nature de l'organe	Matière sèche p. 100	Masse par plante en g	Teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 grammes de matière fraîche ou sèche			
			TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes 1	21	1,524	370	1765	5,65	
Tiges + Pétioles	88	1,119	61	219	0,70	= 6,35 88 p 100
Limbes 2		1,239	423	2019	5,25	
Tiges + Pétioles		0,887	59	214	0,50	= 5,75 91
Limbes 3		0,935	668	3906	6,25	
Tiges + Pétioles		0,747	99	352	0,70	= 6,95 90
Limbes 4		0,691	448	2517	3,65	
Tiges + Pétioles		0,574	78	281	0,45	= 4,10 90
Limbes 5		0,822	523	2529	4,30	
Tiges + Pétioles		0,566	69	244	0,40	= 4,70 91

Légende :
TMF - teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 g de matière fraîche
TMS - teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 g de matière fraîche
TP - teneur en flavonoïdes exprimée en mg par plante
Teneur moyenne en flavonoïdes des limbes par plantule : 5 mg

Tableau XXV

Teneur en flavonoïdes de plantules de 78 jours

Nature de l'organe	Masse par plante	Teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 grammes de matière fraîche ou sèche			
		TMF	TMS	TP	Pourcent. du total
Limbes 1	2,98	875	4899	13,7	89 p 100
Tiges + Pétioles	2,75	477	3921	2,8	
Limbes 2	4,36	1770	9572	38	89
Tiges + Pétioles	3,05	855	6315	4,3	
Limbes 3	2,40	2385	12876	27,6	86
Tiges + Pétioles		1254	9387	4,9	
Limbes 4	3,54	2391	12811	40,6	86
Tiges + Pétioles		970	8446	6,7	
Limbes 5	1,96	2420	13151	23,7	92
Tiges + Pétioles		858	6866	2	

Légende :
TMF - teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 g de matière fraîche
TMS - teneur en flavonoïdes exprimée en mg pour 100 g de matière fraîche
TP - teneur en flavonoïdes exprimée en mg par plante
Teneur moyenne en flavonoïdes des limbes par plantule : 30,6 mg

En consultant les tableaux XXII à XXV, nous observons que les limbes au début (5 jours) contiennent la presque totalité des flavonoïdes (98 pour 100 des flavonoïdes totaux de la plantule), teneur qui diminue après, en restant toujours supérieure à 86 pour 100.

Au point de vue de l'apparition des flavonoïdes, A' et B' se trouvent dans les plantules de 5 jours alors que le flavonoïde B n'a été mis en évidence que dans les plantules de 15 jours.

B - Culture en microphytotron

Pour étudier l'influence de la lumière sur la teneur en flavonoïdes de la Bryone, nous avons mené une série d'expériences dans un micro-phytotron.

Le régime était celui des jours longs de 16 heures, avec température diurne de 22 à 23°C correspondant au climat de Mai - Juin. Cependant les conditions d'éclairement ont été très différentes car nous n'avons pu dépasser une intensité lumineuse de 16 000 lux.

Chaque fois, le dosage des flavonoïdes a été fait par spectrophotométrie et n'a porté que sur les limbes foliaires.

Les teneurs appréciées dans les autres parties de la plante (tige, pétiole), étaient trop faibles (le spectre n'est pas caractéristique). Pour chaque expérience, pour un même essai, nous avons réuni les limbes de plusieurs plantules en raison de leur faible masse.

- Conditions expérimentales

On opère avec des graines récoltées en 1964, 1965, 1966, conservées à la température ambiante. Le pourcentage de germinations n'a pas été modifié par l'âge des graines.

Des lots de 130 graines maintenues préalablement au réfrigérateur pendant 10 jours, triées, sont semés dans des terrines de 30 cm/40 cm et introduits au microphytotron aux trois niveaux d'éclairement (16 000 lux, 6 000 lux et 1 700 lux).

1ère Expérience - Octobre 1966

Expérience réalisée avec des graines de 1964. Récolte des plantules âgées de 3 semaines.

On obtient :

14 plantules au niveau 1 700 lux (fig. 6)

25 plantules au niveau 6 000 lux (fig. 7)

25 plantules au niveau 16 000 lux (fig. 8)

La taille des plantules est très irrégulière aux trois niveaux. Celles soumises à 1 700 lux sont hautes et grêles ; pour les autres éclairements les

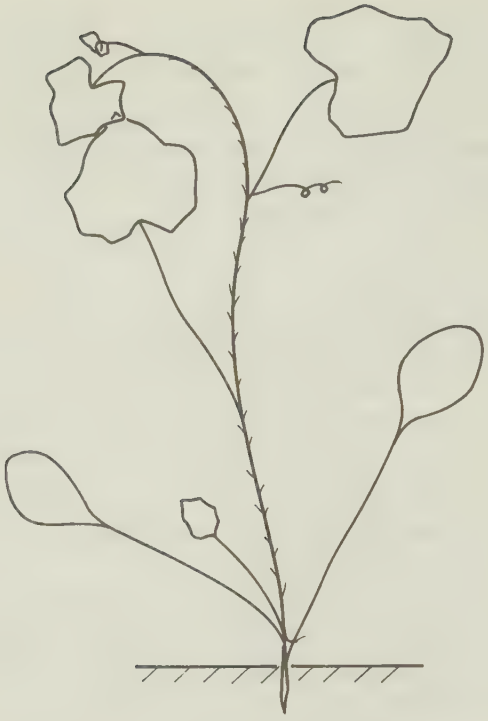


Figure 6 - Plantule agée de 3 semaines (Niveau d'éclairement : 1700 lux).

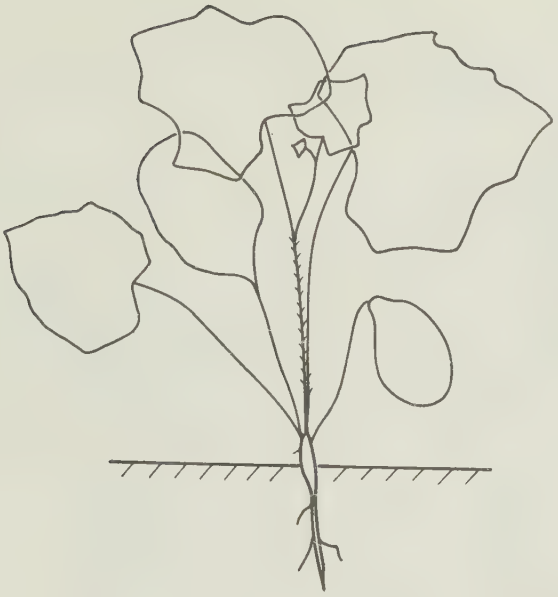
plantules sont petites, leur tige est très courte, les limbes sont épais et plus développés. On réalise 5 lots à chaque niveau.

Tableau XXVI

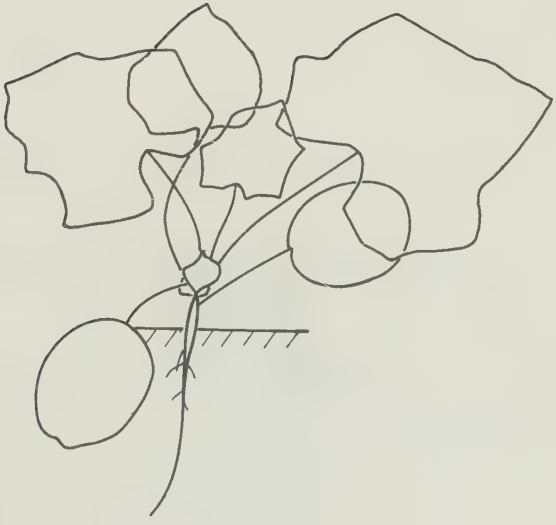
Expérience n° 1 - Octobre 1966
Plantules âgées de 3 semaines

N° de l'expérience	1 700 lux		6 000 lux		16 000 lux	
	Masse	Taux de Fv	Masse	Taux de Fv	Masse	Taux de Fv
L_1	0,153	107	0,854	101	1,554	104
L_2	0,177	121	0,763	108	1,079	146
L_3	0,150	130	0,739	111	1,139	205
L_4	0,130	143	0,809	129	0,803	264
L_5	0,142	151	0,739	135	0,848	275

Masse - exprimée en grammes
Taux de flavonoïdes - exprimé en mg de flavonoïdes totaux pour 100 g de limbes foliaires frais
L_1 , L_2, L_3, L_4, L_5 - échantillons de limbes foliaires correspondant chacun à un lot de plantule (3 à 5)



Niveau d'éclairement : 6000 lux.



Niveau d'éclairement : 16000 lux.

Figures 7 et 8 - Plantules agées de 3 semaines.

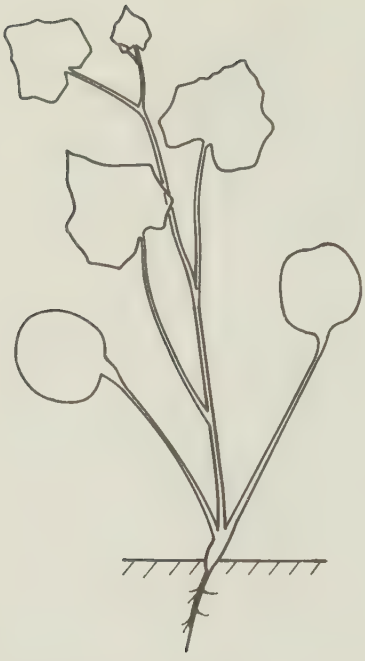


Figure 9 - Plantule agée de 4 semaines (Niveau d'éclairement : 1700 lux).

Figure 10 - Plantule agée de 4 semaines (Niveau d'éclairement : 6000 lux).

Figure 11 - Plantule agée de 4 semaines (Niveau d'éclairement : 16000 lux).

• 2ème Expérience - Décembre 1966

Les plantules récoltées sont âgées de 4 semaines. La récolte est plus abondante aux trois niveaux que lors de la première expérience (fig. n° 9, n° 10, n° 11).

Les plantules sont plus robustes, plus grandes, le nombre de feuilles est plus important (5 à 7), et il y a quelques vrilles.

Au point de vue de la teneur en flavonoïdes, les écarts sont plus marqués entre les 3 niveaux d'éclairement, mais les plantules sont moins riches en flavonoïdes.

Il semble que l'augmentation de taille n'ait pas été accompagnée de celle de la teneur en pigments flavoniques - d'où diminution de la teneur en flavonoïdes exprimée en mg par gramme de matière fraîche.

Tableau XXVII

Expérience n° 2 - Décembre 1966
Plantules âgées de 4 semaines

N° de l'expérience	1700 lux		6000 lux		16000 lux	
	Masse	Taux de Fv	Masse	Taux de Fv	Masse	Taux de Fv
L_1	0,3134	17	1,170	49	2,458	113
L_2	0,345	19	1,423	51	2,061	119
L_3	0,263	33	0,940	55	2,444	129
L_4	0,408	35	1,314	57	2,039	126
L_5	0,374	38	1,480	57	2,114	137

Masse - exprimée en grammes
Taux de flavonoïdes - exprimé en mg de Flavonoïdes totaux pour 100 g de limbes foliaires frais.

• Expériences n° 3 et n° 4 (Tableaux XXVIII et XXIX)

Expériences réalisées comparativement entre graines de 1964 et graines de 1966.

Les plantules récoltées sont agées de 3 semaines le pourcentage des germinations n'a pas été influencé par l'age des graines, mais on remarque que les teneurs en flavonoïdes sont plus élevées aux 3 niveaux d'éclairement avec les plantules issues des graines de 1966.

• 5ème Expérience - Mars 1967

Nous avons récolté des plantules de 1 jour. La récolte s'est donc poursuivie du 23 Février 1967 au 17 Mars 1967. Nous avons récolté :

Tableau XXVIII

Expérience n° 3 - Janvier 1967
Plantules âgées de 3 semaines

N° de l'expérience	1 700 lux		6 000 lux		16 000 lux	
	Masse	Taux de Fv	Masse	Taux de Fv	Masse	Taux de Fv
L_1	0,349	69	0,390	92	0,413	157
L_2	0,314	80	0,350	137	0,126	192
L_3	0,320	104	0,303	145	0,458	218
L_4	0,282	106	0,375	151	0,385	225
L_5	0,222	126	0,303	177	0,866	228

Masse - exprimée en grammes
Taux de flavonoïdes - exprimé en mg de flavonoïdes totaux pour 100 g de limbes frais.

Tableau XXIX

Expérience n° 4 - Janvier 1967
Plantules de 3 semaines

N° de l'expérience	1700 lux		6 000 lux		16 000 lux	
	Masse	Taux de Fv	Masse	Taux de Fv	Masse	Taux de Fv
L_1	0,343	129	0,390	169	0,648	273
L_2	0,322	132	0,350	175	0,670	281
L_3			0,303	177	0,611	307
L_4			0,375	195	0,491	322
L_5			0,303	240	0,498	385

Masse - exprimée en grammes
Taux de flavonoïdes - exprimé en mg de flavonoïdes totaux pour 100 g de limbes frais.

- au niveau 1 700 lux - 27 plantules
- au niveau 6 000 lux - 5 plantules
- au niveau 16 000 lux - 13 plantules

Les plantules récoltées tous les jours ont été pesées, puis conservées à l'abri de la lumière, à la température ordinaire jusqu'à la fin de la récolte.

Le dosage a été effectué dans les conditions habituelles. Le spectre U.V. des flavonoïdes a été effectué en présence de chlorure d'aluminium

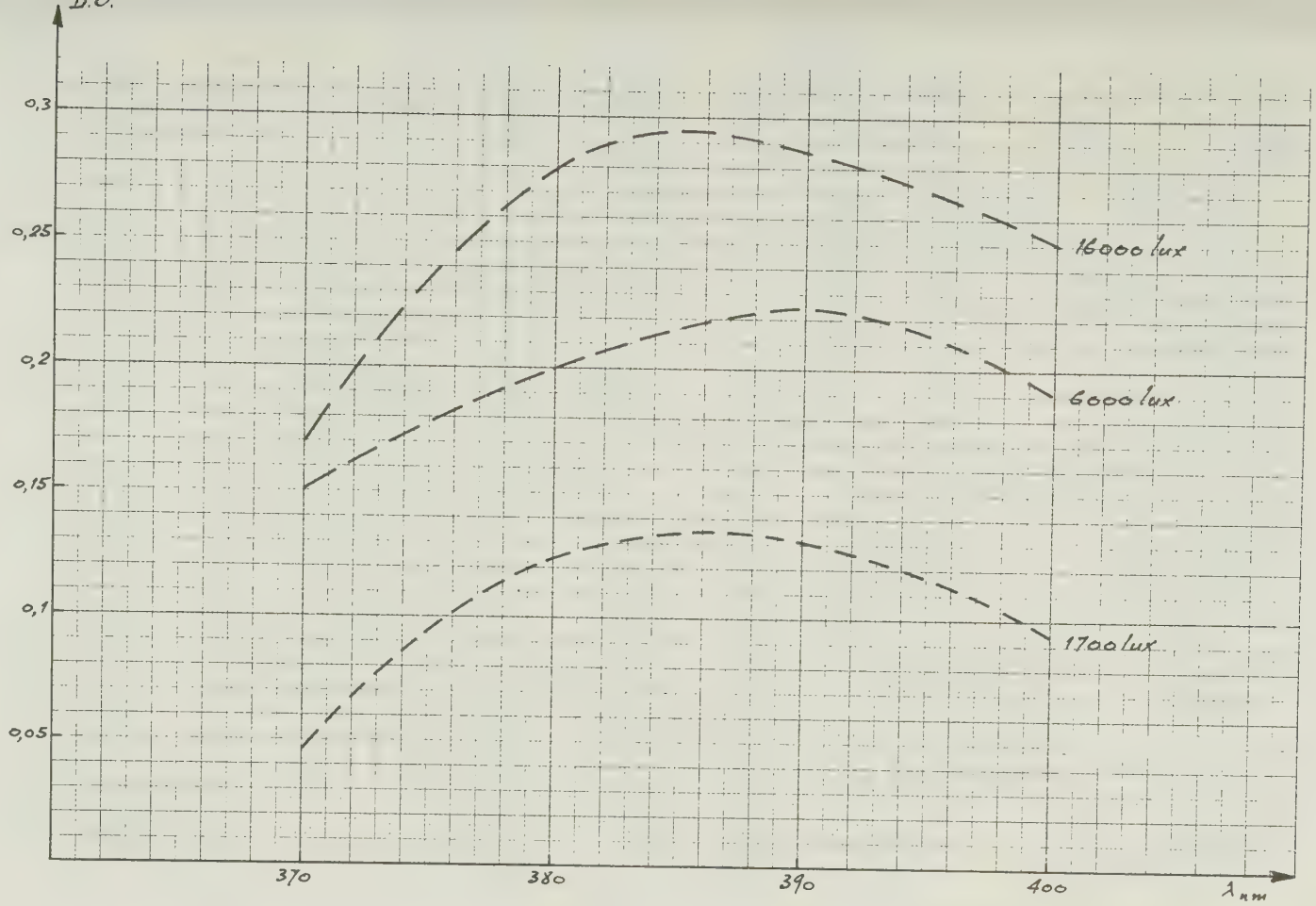


Figure 12 - Limbes agés de 1 jour. Spectre UV des solutions de flavonoïdes totaux en présence de $AlCl_3$

(fig. 12) : le maximum d'absorption est voisin de 388 nm. Les résultats sont rapportés dans le tableau XXX.

● Remarques sur l'ensemble des expériences réalisées en "microphytotron" :

Les écarts entre la teneur en flavonoïdes des plantules des trois niveaux d'éclairement sont très marqués pour les plantules de 1 jour :

	1700 lux	6000 lux	16000 lux
1 jour	1	6	20
3 semaines	6	7	10
4 semaines	1	3	7

Taux moyens (moyenne de 5 expériences) de flavonoïdes exprimés en mg pour 100 g de matière fraiche.

En résumé, chez les plantules de 1 jour, l'accroissement de l'éclairement provoque une augmentation importante de la teneur en flavonoïdes.

Chez les plantules plus âgées, l'augmentation de teneur en flavonoïdes est peu sensible et les modifications paraissent porter surtout sur la morphologie et notamment sur la masse des limbes.

C - Plantules cultivées à l'obscurité

Quatre lots de 130 graines sont mis à germer à l'obscurité (30 Décembre 1966). Ce sont des graines ayant passé une dizaine de jours au réfrigérateur pour accélérer et régulariser la germination.

Le 7 Janvier, nous sommes obligés d'arrêter l'expérience bien que très peu de graines aient germé, car les plantules devenues trop grandes commençaient à s'étioler.

Les plantules obtenues sont divisées en 4 lots :

1 Lot (LT) témoin, reste à l'obscurité
1 Lot (L_1) est éclairé 1 minute à 1000 lux
1 Lot (L_5) est éclairé 5 minutes à 1000 lux
1 Lot (L_{20}) est éclairé 20 minutes à 1000 lux

Elles sont remises pendant deux jours à l'obscurité et récoltées le 9 Janvier.

- Résultats

1er lot témoin toujours à l'obscurité : 23 mg de flavones pour 100 g de matière fraiche.

2ème Lot éclairé Une minute à 1000 lux : 27 mg de flavones pour 100 g de matière fraîche

Tableau XXX

Expérience n° 5 - Mars 1967
Plantules récoltées âgées de 1 jour

N° de l'expérience	1 700 lux		6 000 lux		16 000 lux	
	Masse	Taux de Fv	Masse	Taux de Fv	Masse	Taux de Fv
L frais	0,248	13	0,095	57	0,277	207
L sec	0,108	348	0,023	1140	0,053	1320
	Teneur en matière sèche : 43 pour 100		Teneur en matière sèche : 24 pour 100		Teneur en matière sèche : 19 pour 100	

Masse - exprimée en grammes
Taux de flavonoïdes - exprimé en mg de flavonoïdes totaux pour 100 g de matière fraîche et pour 100 g de matière sèche.

3ème Lot éclairé Cinq minutes à 1 000 lux : 29 mg de flavones pour 100 g de matière fraîche

4ème Lot éclairé Vingt minutes à 1 000 lux : 37 mg de flavones pour 100 g de matière fraîche

- Teneur en matière sèche : 10 pour 100

Si nous examinons les spectres UV des solutions extractives des limbes en présence de chlorure d'aluminium, nous remarquons que celui des flavonoïdes de L_{20} est le plus proche de celui du flavonoïde A (fig. 13) ; L_5 le suit ; pour L_1 et surtout L_T, il semble que d'autres substances soient intervenues dans le dosage, car la courbe ne présente pas de maximum à 388 nm caractéristique du spectre des flavonoïdes de la Bryone.

Il semble bien que la lumière favorise la production des flavonoïdes nettement caractérisés après un éclairement de 20 minutes à 1 000 lux.

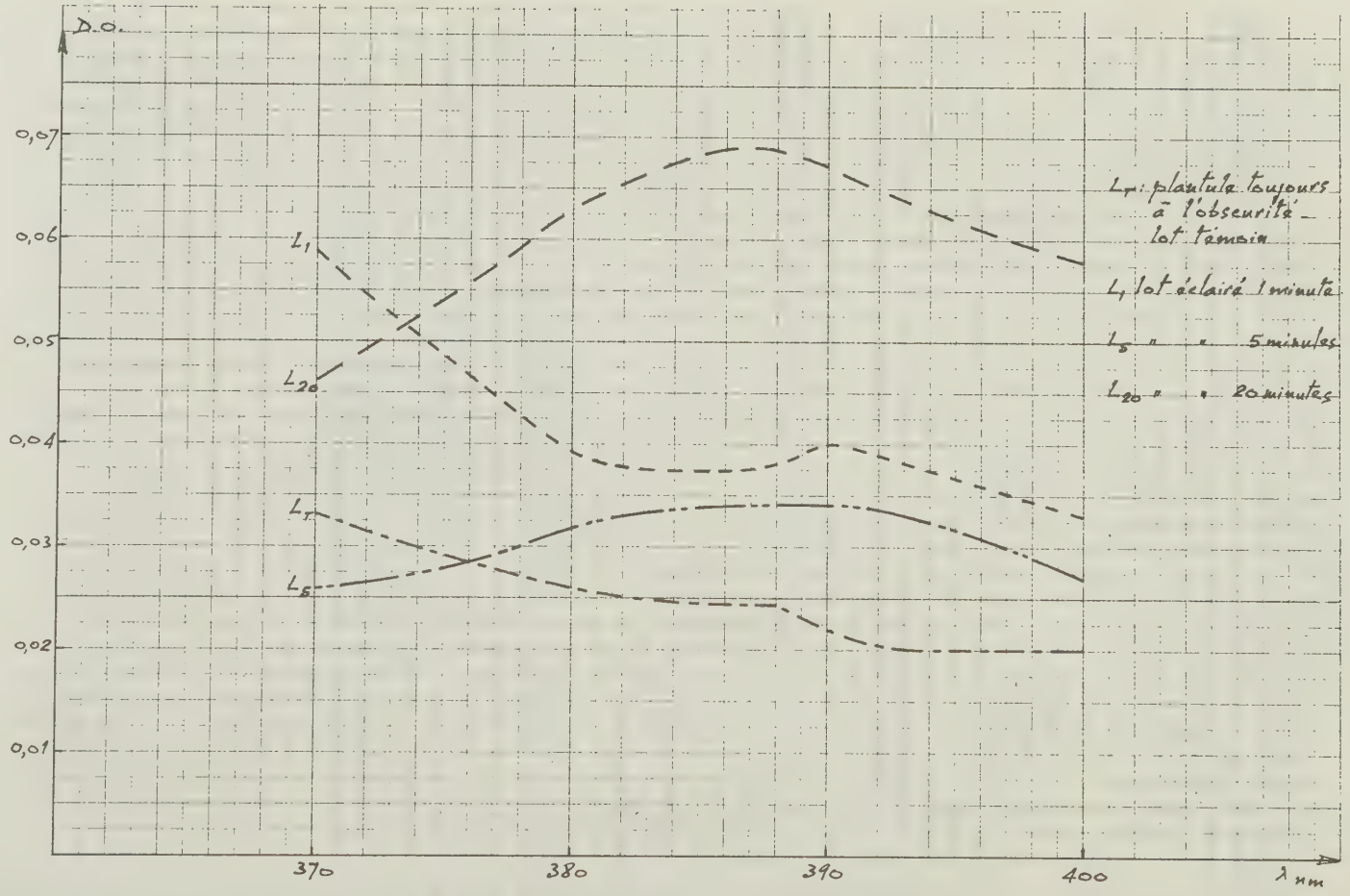


Figure 13 - Plantules cultivées à l'obscurité.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Après un bref rappel des caractères botaniques et de la composition chimique de la Bryone, ce travail a été consacré à l'étude des flavonoïdes des parties aériennes de la plante. Ceux-ci constituent la majorité des composés polyphénoliques de la Bryone. En effet les acides-phénols ne semblent présents qu'à l'état de traces, les catéchols, leucoanthocyanes et tanins sont absents. Par contre, les flavonoïdes sont abondants (5 g de flavonoïdes totaux bruts par Kg de feuilles sèches).

Par chromatographie sur papier, quatre substances de nature flavonique, provisoirement dénommées A, B, A', B', ont été mises en évidence ; elles ont été séparées par chromatographie préparative sur papier et sur plaque.

Le flavonoïde A, le plus abondant, a été obtenu à partir d'une colonne de cellulose ; ce flavonoïde appartient au groupe des hétérosides difficilement hydrolysables encore appelés C-glucosides (où l'ose est fixé sur le cycle aromatique par une liaison carbone - carbone sans l'intermédiaire d'un hydroxyle). L'étude de ses propriétés a été faite à l'aide de nombreuses méthodes analytiques, en particulier : chromatographie sur papier et sur couche mince, spectrophotométrie U.V. et I.R. La substance n'est pas dédoublée dans les conditions normales d'hydrolyse acide, mais en présence d'oxydants (chlorure ferrique) on obtient une génine identifiée à l'apigénine ou tri-hydroxy-5, 7, 4' flavone.

Ces différents résultats, la microdégradation alcaline et l'analyse élémentaire concourent à identifier ce produit A appelé d'abord bryoflavonoside, à *l'alliaroside* déjà isolé de *l'Alliaria officinalis* Andr. et qui est un C-glucoside de la série de l'apigénine. Le flavonoïde B n'a été obtenu qu'à l'état amorphe et en très petite quantité ; il semble que ce soit un C-glucoside de la lutéoline, de la série de l'orientine ; les substances A' et B', très peu abondantes, ont été obtenues uniquement en solution.

Afin de suivre la répartition des flavonoïdes dans les différents organes et les variations au cours de la végétation, une méthode de dosage des flavonoïdes totaux a été mise au point, qui nécessite d'abord l'extraction, puis la purification de l'extrait brut obtenu.

Le dosage spectrophotométrique des chélates formés avec l'aluminium a été préféré à la densitométrie des taches séparées par chromatographie ; les résultats sont exprimés en flavonoïde A.

Malgré quelques réserves, en ce qui concerne la précision du dosage, (erreurs dues à ce que l'effet bathochrome en présence de chlorure d'aluminium est moins prononcé pour les flavones que pour les flavonols, expression des résultats en fonction du flavonoïde A), la méthode retenue est sensible, fidèle, et susceptible d'applications en série.

La répartition des flavonoïdes est très inégale dans les différentes parties de la plante : les racines n'en renferment pas et il semble exister une augmentation de teneur du collet à l'extrémité supérieure de la tige ; les limbes jeunes des feuilles du tiers supérieur sont les organes les plus riches, ils contiennent toujours entre 70 et 90 pour 100 des flavonoïdes totaux de la plante ; les pétioles des feuilles du tiers supérieur sont plus riches que ceux des limbes du tiers moyen, eux-mêmes plus riches que ceux des feuilles du tiers inférieur ; la teneur des tiges est inférieure à celle des pétioles ; nous avons relevé des différences entre les vrilles enroulées et les flagelles qui se sont montrés plus riches en flavonoïdes. Pour les échantillons (malheureusement assez réduits) examinés, la teneur des fleurs mâles est plus élevée que celle des fleurs femelles. Les fruits verts ou mûrs ne contiennent que des traces de flavonoïdes et les graines n'en contiennent pas du tout.

Pour des raisons matérielles, il n'a pas été possible de multiplier les essais et de présenter les résultats sous forme de données statistiques. Après avoir envisagé la répartition des flavonoïdes dans la plante, quelques essais ont été effectués pour suivre l'évolution de ces substances au cours de la végétation. Mais de nombreuses difficultés ont été rencontrées.

La germination des graines de Bryone est très irrégulière et le pourcentage des plantules obtenues très faible (15 pour 100). Nous avons effectué, d'une part, quelques cultures en pleine terre, d'autre part des essais dans un microphytotron permettant de réaliser trois niveaux d'éclairement. Pour les plantules cultivées en pleine terre, 5, 15 et 30 jours, l'augmentation de la masse des limbes, très importante, ne s'accompagne pas d'une augmentation parallèle de la teneur en flavonoïdes totaux. Les stades de floraison et de fructification n'ont pu être obtenus dans les cultures expérimentales réalisées en pleine terre, ce qui nous a empêché de suivre l'évolution à ces stade terminaux.

Pour les plantules cultivées au microphytotron à trois niveaux d'éclairement différents (1700, 6000 et 16000 lux), les plantules réagissent aux variations d'éclairement en lumière blanche par des modifications morphologiques et par des variations de la teneur en flavonoïdes.

Pour les plantules de 1 jour, l'augmentation de la teneur en flavonoïdes d'un niveau d'éclairement à l'autre, est très marquée et l'emporte sur les modifications morphologiques, alors que pour les plantules âgées de trois et quatre semaines l'effet de la lumière porte plutôt sur la masse des limbes que sur leur teneur en flavonoïdes.

Une quantité minimale de lumière semble nécessaire pour déclencher la formation des flavonoïdes : un éclairement de 1 000 lux pendant vingt minutes amène la production d'une quantité notable de ces pigments.

En ce qui concerne la répartition des différents flavonoïdes, on constate que la substance A est prépondérante dans la plante à tous les stades de la vie végétative. Elle a été la seule substance mise en évidence dans les plantules cultivées au microphytotron (1 jour, 3 et 4 semaines), dans les pétioles des plantes en fleurs et en fruits. A' et B' n'ont pu être caractérisés dans les vrilles et les flagelles.

On note l'apparition de A' et de B' dans les plantules de 5 jours alors que B n'apparait que dans les plantules de 15 jours. Dans les limbes des plantes au stade vrilles, fleurs et fruits, les quatre flavonoïdes ont pu être caractérisés.

Si malgré un travail long et difficile, tous les résultats escomptés n'ont pas été obtenus, nous pensons néanmoins avoir apporté une contribution utile à l'étude d'une plante indigène à C-flavonoïdes, et nous espérons que cette étude pourra servir de base à de nouvelles recherches dans ce domaine.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAHAM R.J., 1964 - Nuclear magnetic resonance spectroscopy In PRIDHAM J.B. - Methods in polyphenol chemistry, 49-56, Pergamon, Press, London.

BASSLER R., 1957 - Der Einfluss okologischer und ontogenetischer Faktoren auf die Flavone von *Fagopyrum sagittatum* Gilib., *Die Pharmazie, 12,* 758-772.

BATE-SMITH E.C., 1962 - The phenolic constituents of plants and their taxinomic significance I. Dicotyledons. *J. Linn. Soc. London* (Botany), *58,* 95-73.

BIGLINO G., 1959 - Constituents of the root of *Bryonia dioica. Ann. Chim. (Roma), 49,* 782-792.

BIGLINO G., LEHN J.M. et OURISSON C., 1963 - Constituants de la racine de *Bryonia dioica* Jacq., structure de la bryogénine. *Tetrahedron Letters, III, 24,* 1651-1657.

BRAEMER L., 1893 - Localisation des principes actifs des Cucurbitacées. Recherches histologiques et histochimiques. *Thèse Doct. Méd.,* Toulouse.

CHAZE J., 1932 - De l'existence d'un nouveau principe actif dans *Bryonia dioica, C.R. Ac. Sc., 195,* 825.

CHOPIN J., 1962 - Les C glycoflavonoïdes. In MENTZER C. *Actualités de Phytochimie fondamentale,* 2è série 44-72, Masson ed. Paris.

CLAIR G., DELAVEAU P.G. et PARIS R., 1964 - Sur le métabolisme des pigments flavoniques. Répartition chez le *Sinapis alba* L. et influence de la lumière. *Bull. Soc. Bot. Fr., 111,* 215-218.

DELAVEAU P., 1966 - Dosage des pigments flavoniques chez les végétaux *Produits, Problèmes pharmaceutiques, 21,* 164-167.

DELAVEAU P., 1967 - Les polyphénols, en particulier les flavonoïdes de la Grande Capucine. *Thèse. Doct. Sc. nat. Paris.*

DERIVAUX J. et LIEGEOIS F., 1962 - *Toxicologie vétérinaire,* 232, Vigot ed. Paris.

DUFOUR J., 1886 - Recherches sur l'amidon soluble et son rôle physiologique chez les végétaux. *Bull. Soc. Vaudoise, Sc. nat., 21,* 227-264.

DZEMUKADZE K.M., BUZON G.A. et NESTYUK M.M., 1962 - Dynamique journalière des catéchines et des flavones dans les pieds de Théier. *Biochim. Chain. Proziv., Akad. Nauk SSSR., Inst. Biochim., 9,* 15-19. *Chem. Abstr.,* 1963, *59,* 3082.

ESDORN I. et NOLL G., 1955 - Untersuchungen uber tagesperiodische Schwankungen im Gehalt an Flavonolen bei *Fagopyrum* Arten. *Planta, 45,* 376-378.

FAIRBAIRN J.W. et SIMIC S., 1963 - The quantitative conversion of barbaloin to aloe-emodin and its applications to the evaluation of Aloes. *J. Pharm. and Pharmacol 15,* 325-328.

FOWDEN L. 1961 - A new asparagine derivative N (2 hydroxy-ethyl asparagine) from Bryony *(Bryonia dioica). Biochem. J., 81,* 154-156.

GARNIER G., BEZANGER-BEAUQUESNE L. et DEBRAUX G., 1961 - *Ressources médicinales de la flore française II,* 1267-1269, Vigot ed. Paris.

HAHN G., PATT P., UEBEL H. et VOGEL G., 1963 - *Arzneimittelforschung 23,* 1043-1049.

HEGNAUER R., 1957 - Chemotaxonomischer Ubersichten - V - Cucurbitaceae. *Pharm. Acta Helv. 32,* 334-350.

HEGNAUER R., 1964 - Chemotaxonomie der Pflanzen III - Cucurbitaceae, 608-624 et 675. Birkhauser ed. Bale et Stuttgart.

HARBORNE J.B., 1964 - Ultra-violet et spectroscopy of polyphenols.
In PRIDHAM J.B. - *Methods in polyphenol chemistry,* 13-36, Pergamon Press ed. London.

JURD L., 1962 - Spectral properties of flavonoïd compouds.
In GEISSMAN T.A. - *The chemistry of flavonoid compounds,* 107-155 Pergamon Press, ed. New-York.

KOEPPEN B.H., 1962 - The flavone C-glycosides and flavonol O-glycosides of *Aspalathus acuminatus* (Rooebas Tea) *Biochem. J., 83,* 507.

MALIK N.A., LEBRETON 1965 - Etude du développement et du contenu en flavonoides de lots de *Polygonum tataricum* L. *Thèse Doct. Sc. nat.*, Besançon.

MASCRE M. et PARIS R., 1936 - Recherches biochimiques et pharmacologiques sur le rutoside. *Bull. Sc. Pharmacol. 43,* 279-282.

MASSICOT J. et MARTHE J.P., 1962 - R.M.N. des produits naturels III. Etude de quelques dérivés flavoniques et substances apparentées. *Bull. Soc. chim. Fr.,* 1962-1970.

MASSON 1893 - Les principes actifs de la racine de Bryone. *J. Pharm. et Chimie, 27,* 300.

N'GUYEN HIEP, DELAVEAU P. et PARIS R., 1964 - Sur la dessiccation et la stabilisation des plantes médicinales I. Plantes à hétérosides flavoniques. *Ann. Pharm. fr. 22,* 573-580.

NICK E., 1953 - Beitrage zum Physiologie der Gerbstoffe und Flavonfarbstoffe bei *Polygonum bistorta* L. *Die Pharmazie, 8,* 940-950.

NOLL G., 1955 - Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Faktoren auf den Flavonol Gehalt von *Fagopyrum esculentum* (L.) Moench und *Fagopyrum tataricum* L. (Gartner) *Die Pharmazie* 10, 609-615 ; 679-692.

PARIS M. 1966 - Contribution à l'étude biochimique de la Salicaire *(Lythrum Salicaria* L, Lythracées) et en particulier de ses polyphénols. *Thèse Doct. Etat Pharm.*

PARIS R. et CORNILLEAU J. (Mlle), 1955 - Caractérisation et dosage des dérivés flavoniques. *Ann. Pharm. fr., 13,* 200.

PARIS R. et DELAVEAU P., 1962 - Isolement d'un hétéroside flavonique identifié à l'astragaline des feuilles de Moutarde blanche *(Sinapis alba L.) Lloydia, 25,* 151-155.

PARIS R. et FAUGERAS G., 1955 - Application de l'électrophorèse à la séparation des alcaloïdes et des dérivés flavoniques chez quelques Légumineuses. *Ann. Pharm. fr. 13,* 359-368.

PARIS R. et FAUGERAS F., 1960 - Evaluation densitométrique de quelques flavonoïdes après séparation par électrophorèse sur papier. *Ann. Pharm. fr., 18,* 29-36.

PARIS R., DELAVEAU P. et LEIBA S. (Mme), 1966 - Sur la présence de C-hétérosides chez la Bryone *(Bryonia dioica* Jacq.) *C.R. Acad. Sc., 262,* 1372-1374.

PARIS R. et ETCHEPARE S. (Mlle) - Présence de C-flavonosides chez une Rutacée africaine, le *Teclea sudanica,* A. Chev. *Comm. Acad. Pharm.* 5 Juillet 1967, *Ann. Pharm. fr.* 1967.

PARIS R. et STAMBOULI A., 1961 - Sur quelques flavonoïdes difficilement hydrolysable (scoparoside, cytisoside et aphloioside) *C.R. Acad. Sc., 252,* 1659.

POWER E.B. et MOORE C.W., 1911 - The constituents of Bryony root. *J. Chem. Soc. 99,* 937-946.

ROMISCH H., 1960 - Kolorimetrische Bestimmung des Rutingehalts in Pflanzenextrakten und Präparaten mit Aluminium chlorid in mit Eisessig Pyridin gepuffneter Lösung. *Die Pharmazie 15,* 33-38.

ROLLIN P., 1963 - Influence de la lumière et de la température sur la germination. *Thèse Doct. Sc. nat.,* Paris.

SPRECHER E., 1956 - Beitrage zur Frage der Biogenese sekundärer Pflanzenstoffe der Weinkraute *(Ruta graveolens L.) Planta, 47,* 323-358.

TRONCHET J. (Mme), 1959 - Contribution à l'étude par chromatographie sur papier des flavonoïdes de *Passiflora caerulea* (vrilles stimulées et non stimulées, tiges). *Bull. Soc. Hist. nat. Doubs, 62,* 45-46.

TRONCHET J. (Mme) 1961 - Sur la présence de flavonoïdes dans les tissus corticaux des vrilles et des tiges volubiles, et leur intervention possible dans la circomnutation *86ème Congrès des Sociétés Savantes,* Montpellier.

TROYER J.R., 1956 - Quantitative détermination of buckwheat flavonoïd substances by direct absortiometry of paper chromatograms. *Plant. Physiol. 31,* 71-74.

TUNMANN P. et STAPEL G., 1966 - Uber das Bryodulcosid. 8. Mitt. über Inhaltstoffe der Wurzel von *Bryonia dioica* Jacq. *Arch. d. Pharm., 299,* 596-598.

TUNMANN P. et WIENECKE H., 1960 - Uber das erste kristalline Bitterstoff-Glycosid. Isolierung u. Eigenschaften des Bryoamarids. *Arch. d. Pharm. 295,* 195.

UL-YANOVA, 1962 - Modifications quantitatives et qualitatives des substances flavoniques du Théier. *Biokim. Chain. Proziv. Akad. Nauk. SSSR, 9,* 7-17. *C.A.,* 1963, *59,* 3082.

URVAN R., 1959 - Physiologische Untersuchungen über einige Flavonoid und Oxyzimtsaürer II Mitt. Untersuchungen über den jahreszeitlichen und tagesperiodischen Verlauf der Stoffbildung. *Planta, 52,* 565-582.

WAGNER H., 1964 - Infrared spectroscopy of flavonoids. In PRIDHAM J.B. *Methods in polyphenol chemistry.* 37-48, Pergamon Press ed., London.

WAGNER H., 1966 - Flavonoid C glycosides. IN SWAIN, *Comparative phytochemistry,* 309-318. Academic Press ed. London.

WEHMER C., 1931 - *Die Pflanzenstoffe, II,* 1200 1201, Iena, Gustav Fischer ed.

WEHMER C., 1935 - *Die Pflanzenstoffe,* Ergänzungsband, 32. Iena, Gustav Fischer ed.

ZELLNER J. et TASCHNER E., 1927 - Studien über chemischen Bestandteile heimischer Arzneipflanzen. *Arch. d. Pharm., 265,* 34-41.

Vu
Le Président de Thèse
Professeur R. PARIS

Vu
le Doyen de la Faculté
Professeur P. MALANGEAU

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
J. ROCHE

IMPRIMERIE LOUIS-JEAN
Publications scientifiques et littéraires
TYPO - OFFSET
05 - GAP - Téléphone 14-23 14-24
Dépot légal : n° 446 1969